

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

2024, том 13, № 4

Восточная  
Европа

Laboratory Diagnostics Eastern Europe

International Scientific Journal

2024 Volume 13 Number 4



Анапаит (таманит) – довольно редкий минерал класса фосфатов. Впервые был обнаружен в 1899 году на мысе Железный Рог Таманского полуострова (ныне – Краснодарский край России) во время геологического маршрута С.П. Попова. Однако первым описать минерал успел немецкий исследователь Артур Закс в 1902 году, получивший образец от минералогической фирмы Krantz с адресом: «мыс Железный Рог на Тамани, недалеко от Анапы». Закс назвал новый минерал анапаитом, а статья Попова о находке вышла годом позже (1903), что не позволило прижиться предложенному им названию «таманит».

ISSN 2226-5392 (Print)  
ISSN 2522-137X (Online)



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ  
ИЗДАНИЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

International Scientific Journal

## Laboratory Diagnostics Eastern Europe

LABORATORNAYA DIAGNOSTIKA VOSTOCHNAYA EVROPA

lab.recipe.by

2024, том 13, № 4

2024 Volume 13 Number 4

Основан в 2011 г.

Founded in 2011

### Беларусь

### Belarus

#### Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь  
2 декабря 2011 г.  
Регистрационное свидетельство № 1496

#### The journal is registered

by the Ministry of information of the Republic of Belarus  
on December 2, 2011  
Registration certificate No. 1496

#### Учредитель

УП «Профессиональные издания»

#### Founder

UE "Professional Editions"

#### Редакция:

Директор Л.А. Евтушенко

Заместитель главного редактора А.В. Жабинский

Руководитель службы рекламы и маркетинга М.А. Коваль

Технический редактор Д.В. Нужин

#### Editorial office:

Director L. Evtushenko

Deputy editor-in-chief A. Zhabinski

Head of advertising and marketing department M. Koval

Technical editor D. Nuzhin

#### Адрес:

220035, Республика Беларусь, г. Минск,  
ул. Тимирязева, 67, офис 1103, п/я 5  
Тел.: +375 17 322-16-59  
e-mail: lab@recipe.by

#### Address:

67 Timiryazev st., office 1103, Minsk,  
220035, Republic of Belarus, P.O. box 5  
Phone: +375 17 322-16-59  
e-mail: lab@recipe.by

#### Подписка

В каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь):  
индивидуальный индекс – 01389, ведомственный индекс – 013892

#### Subscription

In the catalog of the Republican unitary enterprise "Belposhta" (Belarus):  
individual index – 01389, departmental index – 013892

В электронных каталогах на сайтах агентств:  
ООО «Прессинформ», ООО «Криэтив Сервис Бэнд»,  
ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:  
LLC "Pressinform", LLC "Kriektiv Servis Bend",  
LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

Электронная версия журнала доступна на сайте lab.recipe.by,  
в Научной электронной библиотеке eLibrary.ru, в базе данных  
East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks

The electronic version of the journal is available on lab.recipe.by,  
on the Scientific electronic library eLibrary.ru,  
in the East View database, in the electronic library system IPRbooks

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию  
Журнал выходит один раз в три месяца  
Цена свободная

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office  
The frequency of the journal is 1 time in 3 months  
The price is not fixed

Подписано в печать: 14.11.2024  
Формат 70×100 1/16  
Печать офсетная  
Тираж 1000 экз.  
Заказ №

Sent for the press: 14.11.2024  
Format 70×100 1/16  
Litho  
Circulation is 1000 copies  
Order No.

#### Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие  
«Типография Федерации профсоюзов Беларуси».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя,  
изготовителя, распространителя печатных изданий  
№2/18 от 26.11.2013.  
пл.Свободы, 23, каб 94, г. Минск.  
ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

#### Printed in printing house

#### © «Лабораторная диагностика Восточная Европа»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов  
издания возможно только с обязательной ссылкой на источник.  
© УП «Профессиональные издания», 2024  
© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2024

#### © "Laboratory Diagnostics Eastern Europe"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition  
is possible only with an obligatory reference to the source.  
© UE "Professional Editions", 2024  
© Design and decor of UE "Professional Editions", 2024

**Главные редакторы:**

**Камышников Владимир Семенович,**  
д.м.н., проф. (Беларусь)

**Припутневич Татьяна Валерьевна,**

чл.-корр. РАН, д.м.н., доц., директор Института микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии  
Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова,  
главный внештатный специалист по медицинской микробиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (Россия)

**Редакционная коллегия:**

Алехнович Л.И., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Алиева Е.В., д.м.н., доц., Центр подготовки медицинских микробиологов Российской медицинской академии непрерывного  
профессионального образования (Москва, Россия)  
Аниско Л.А., к.м.н., Городская клиническая инфекционная больница (Минск, Беларусь)  
Батуревич Л.В., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Беляев С.А., Белорусское общество лабораторной медицины (Минск, Беларусь)  
Вавилова Т.В., д.м.н., проф., Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия)  
Вергун О.М., к.б.н., доц., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Владимирская Т.Э., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Гордеев А.Б., к.б.н., Институт микробиологии, антимикробной терапии и эпидемиологии Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Гусина Н.Б., к.м.н., доц., Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя» (Минск, Беларусь)  
Державец Л.А., д.б.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Долгов В.В., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)  
Доценко Э.А., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Дубровский А.Ч., к.м.н., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Иванец Т.Ю., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Ильина Е.Н., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Москва, Россия)  
Кафарская Л.И., д.м.н., проф., Российский национальный исследовательский медицинский университет  
имени Н.И. Пирогова (Москва, Россия)  
Коломиец Н.Д., д.м.н., проф., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Кольцов И.П., к.м.н., доц., Дальневосточный государственный медицинский университет (Хабаровск, Россия)  
Конева Н.Ю., д.б.н., проф., Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (Витебск, Беларусь)  
Кочетов А.Г., д.м.н., Российский университет дружбы народов (Москва, Россия)  
Кречетова Л.В., д.м.н., Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии  
и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Кузьменко А.Т., к.м.н., доц., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Лелевич В.В., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)  
Ляликов С.А., д.м.н., проф., Гродненский государственный медицинский университет (Гродно, Беларусь)  
Манаева Н.А., к.б.н., Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь)  
Новикова И.А., д.м.н., проф., Гомельский государственный медицинский университет (Гомель, Беларусь)  
Потапнев М.П., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр трансфузиологии  
и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь)  
Прохорова В.И., д.м.н., проф., Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии  
имени Н.Н. Александрова (Минск, Беларусь)  
Ребриков Д.В., проф. РАН, д.б.н., проф., Институт трансляционной медицины Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)  
Смолякова Р.М., д.б.н., проф., Минский областной клинический госпиталь инвалидов Великой Отечественной войны  
имени П.М. Машерова (Минск, Беларусь)  
Степаненко И.С., д.м.н., доц., Волгоградский государственный медицинский университет (Волгоград, Россия)  
Таганович А.Д., д.м.н., проф., Белорусский государственный медицинский университет (Минск, Беларусь)  
Трофимов Д.Ю., чл.-корр. РАН, д.б.н., проф., Институт репродуктивной генетики Национального медицинского  
исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (Москва, Россия)

**Рецензируемое издание**

Включено в базы данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, РИНЦ.

Включено в перечни Высших аттестационных комиссий Республики Беларусь и Российской Федерации.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точку зрения автора.

Ответственность за содержание рекламных материалов и публикаций с пометкой «На правах рекламы» несут рекламодатели.

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

# ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Восточная  
Европа

International Scientific Journal

## Laboratory Diagnostics Eastern Europe

LABORATORNAYA DIAGNOSTIKA VOSTOCHNAYA EVROPA

lab.recipe-russia.ru

2024, том 13, № 4

2024 Volume 13 Number 4

Основан в 2011 г.

Founded in 2011

### Россия

#### Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 25 августа 2023 г. Свидетельство ПИ № ФС77-85799

#### Учредитель и издатель

ООО «Вилин – Профессиональные издания»

#### Редакция:

Директор А.В. Сакмаров

Главный редактор Т.В. Припутневич

#### Адрес редакции и издателя:

214522, Смоленская обл., Смоленский р-н, с.п. Катынский, п. Автoremзавод, д. 1А, пом. 413  
Тел.: +7 4812 515923  
e-mail: lab@recipe.by

#### Подписка

В электронных каталогах на сайтах агентств:  
ООО «Прессинформ», ООО «Криэтив Сервис Бэнд»,  
ООО «Екатеринбург-ОПТ», ООО «Глобалпресс»

Электронная версия журнала доступна на сайте lab.recipe-russia.ru, в Научной электронной библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks

Подписано в печать: 14.11.2024

Дата выхода в свет: 22.11.2024

Формат 70×100<sup>1/16</sup>

Печать офсетная

Тираж 3000 экз.

Заказ №

16+

Журнал выходит один раз в три месяца

Цена свободная

#### Отпечатано в типографии

Производственное дочернее унитарное предприятие «Типография Федерации профсоюзов Беларуси». Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий №2/18 от 26.11.2013. пл.Свободы, 23, каб 94, г. Минск. ЛП №02330/54 от 12.08.2013.

© «Лабораторная диагностика Восточная Европа»

Авторские права защищены.

Любое воспроизведение материалов издания возможно только с обязательной ссылкой на источник.

© ООО «Вилин – Профессиональные издания», 2024

### Russia

#### The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media (Roskomnadzor) on August 25, 2023 Certificate ПИ No. ФС77-85799

#### Founder and Publisher

LLC "Vilin – Professional Editions"

#### Editorial office:

Director A. Sakmarov

Editor-in-Chief T. Priputnevich

#### Editorial and publisher address:

214522, Smolensk region, Smolensk district, rural settlement Katynskoye, Avtoremzavod village, 1A, office 413  
Phone: +7 4812 515923  
e-mail: lab@recipe.by

#### Subscription

In the electronic catalogs on web-sites of agencies:  
LLC "Pressinform", LLC "Kriektiv Servis Bend",  
LLC "Ekaterinburg-OPT", LLC "Globalpress"

The electronic version of the journal is available on lab.recipe-russia.ru, on the Scientific electronic library eLibrary.ru, in the East View database, in the electronic library system IPRbooks

Sent for the press: 14.11.2024

Release date: 22.11.2024

Format 70×100<sup>1/16</sup>

Litho

Circulation is 3000 copies

Order No.

16+

The frequency of the journal is 1 time in 3 months

The price is not fixed

#### Printed in printing house

© "Laboratory Diagnostics Eastern Europe"

Copyright is protected.

Any reproduction of materials of the edition is possible only with an obligatory reference to the source.

© LLC "Vilin – Professional Editions", 2024

**Editors-in-Chief:**

**Vladimir S. Kamyshnikov,**  
Dr. of Med. Sci., Prof. (Belarus)

**Tatiana V. Priputnevich,**

Assoc. of the Russian Academy of Sciences, Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Head of the Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Head Specialist in Medical Microbiology of the Ministry of Health of the Russian Federation (Russia)

**Editorial Board:**

Alekhovich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Alieva E., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Center for Training of Medical Microbiologists of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Moscow, Russia)

Anisko L., Cand. of Med. Sci., City Clinical Infectious Diseases Hospital (Minsk, Belarus)

Baturevich L., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Beliaev S., Belarusian Society of Laboratory Medicine (Minsk, Belarus)

Derzhavets L., Dr. of Biol. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Dolgov V., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Dotsenko E., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Dubrovsky A., Cand. of Med. Sci., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Gordeev A., Cand. of Biol. Sci., Institute of Microbiology, Antimicrobial Therapy and Epidemiology of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Gusina N., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Republican Scientific and Practical Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus)

Iliina E., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Research Institute for Systems Biology and Medicine of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Moscow, Russia)

Ivanets T., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kafarskaya L., Dr. of Med. Sci., Prof., Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)

Kochetov A., Dr. of Med. Sci., Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow, Russia)

Kolomiets N., Dr. of Med. Sci., Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Koltsov I., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Far Eastern State Medical University (Khabarovsk, Russia)

Konevalova N., Dr. of Biol. Sci., Prof., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (Vitebsk, Belarus)

Krechetova L., Dr. of Med. Sci., National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Kuzmenko A., Cand. of Med. Sci., Assoc. Prof., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Lelevich V., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Lyalikov S., Dr. of Med. Sci., Prof., Grodno State Medical University (Grodno, Belarus)

Manaeva N., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Novikova I., Dr. of Med. Sci., Prof., Gomel State Medical University (Gomel, Belarus)

Potapnev M., Dr. of Med. Sci., Prof., Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (Minsk, Belarus)

Prokhorova V., Dr. of Med. Sci., Prof., N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Minsk, Belarus)

Rebrikov D., Prof. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Translational Medicine of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Smolyakova R., Dr. of Biol. Sci., Prof., Minsk Regional Clinical Hospital for Disabled Veterans of the Great Patriotic War named after P.M. Masherov (Minsk, Belarus)

Stepanenko I., Dr. of Med. Sci., Assoc. Prof., Volgograd State Medical University (Volgograd, Russia)

Taganovich A., Dr. of Med. Sci., Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Trofimov D., Assoc. of RAS, Dr. of Biol. Sci., Prof., Institute of Reproductive Genetics of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (Moscow, Russia)

Vavilova T., Dr. of Med. Sci., Prof., Almazov National Medical Research Centre (Saint Petersburg, Russia)

Vergun O., Cand. of Biol. Sci., Assoc. Prof., Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

Vladimirskaia T., Cand. of Biol. Sci., Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University (Minsk, Belarus)

---

**Peer-Reviewed Edition**

Included in the databases Scopus, Ulrich's Periodicals Directory, EBSCO, CNKI, RSCI.

Included in the lists of the Higher Attestation Commissions of the Republic of Belarus and the Russian Federation.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author.

Responsibility for the content of advertising materials and publications with the mark "As advertisement" are advertisers.

Уважаемые читатели!

Настоящий номер журнала «Лабораторная диагностика Восточная Европа» включает в себя 12 статей, ориентированных на решение актуальных проблем лабораторной медицины: три из них представлены специалистами из Беларуси, две – из России, две – из Узбекистана, одна – из Азербайджана и четыре – из Ирака. Отдельные публикации носят либо преимущественно прикладной, либо фундаментальный характер.

Первые три статьи посвящены вопросам совершенствования клинической лабораторной диагностики соматических заболеваний. Так, сотрудниками Азербайджанского медицинского университета обоснована значимость исследования фолликулостимулирующего гормона крови при бесплодии у мужчин. В статье приведен обстоятельный обзор современных сведений об особенностях изменения гормонального статуса при необструктивной азооспермии, дана интерпретация характера изменений показателей гормональных тестов при различных формах бесплодия. Убедительно показано, что при всех исследованных формах мужского бесплодия наиболее высокой диагностической информативностью обладает тест на определение фолликулостимулирующего гормона в сыворотке крови.

Уделено внимание и разработке новых направлений клинической лабораторной диагностики. Сотрудниками Гомельского государственного медицинского университета и Гомельского областного клинического онкологического диспансера предложена технология исследования «ядрышковых организаторов» в гипоцеллюлярных (т. е. обедненных клетками) цитологических препаратах осадка мочи при отдельных формах патологии мочевого пузыря. Метод оказался прост в исполнении, не требует больших материальных затрат и может быть использован как альтернатива сложному и дорогостоящему иммунохимическому методу исследования при оценке пролиферативной активности клеток.

Специалистами Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова и Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова существенно повышена эффективность прогнозирования тромбоза при беременности путем сочетанного использования двух различающихся методологией исследования способов выявления волчаночного антикоагулянта. Предложенная технология лабораторного исследования имеет перспективы стратификации пациентов по тромботическому риску.



---

Не может не привлечь внимание и продемонстрированный интегрированный подход к диагностике гемолитической болезни новорожденного по системе АВО. Сотрудниками Городского центра трансфузиологии 6-й городской клинической больницы г. Минска, Института повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения Белорусского государственного медицинского университета и Клинического родильного дома Минской области показано, что комплексный анализ иммунологического статуса матери и новорожденного в сочетании с клинико-лабораторным исследованием новорожденного существенно помогает в определении генеза, ранней диагностике гемолитической болезни новорожденного, а также прогнозировании выраженности гемолиза.

В двух статьях, представленных в рубрике «Клиническая инфектология и паразитология», в очередной раз продемонстрирована значимость специальности «клиническая микробиология» как весьма важного раздела предмета «клиническая лабораторная диагностика». Достигнутые их авторами результаты базируются на применении высоких лабораторно-диагностических технологий, состоящих в использовании ПЦР-анализа.

С помощью методов молекулярно-генетического анализа сотрудниками Самаркандского государственного университета, Института зоологии Академии наук Республики Узбекистан и Научно-исследовательского института вирусологии установлена распространенность клещевых трансмиссионных инфекций в Республике Узбекистан; к тому же ими идентифицированы шесть геновариантов риккетсий на исследуемой территории Узбекистана. Более того, показано, что клещи родов *Nyalomma* и *Rhipicerphalus* играют основную роль в передаче риккетсиозов.

Научным коллективом Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии (Беларусь) разработана технология мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для диагностики инвазивных микозов, которая, будучи включенной в методологию комплексного лабораторно-диагностического исследования, во многом способствовала анализу картины циркуляции микромицет дрожжевой и плесневой этиологии в условиях стационара в течение более чем 20-летнего периода.

Наряду с непосредственно востребованными клинической практикой прикладными исследованиями освоен и ряд фундаментальных. К таковым могут быть отнесены все четыре работы из Ирака. Так, невольное привлекает внимание публикация сотрудников

Стоматологического колледжа Университета Багдада, авторы которой обнаружили в экстрактах листьев *Moringa oleifera* вещества, стимулирующие процесс остеогенеза, что открывает новые возможности размещения в костной ткани титановых имплантатов. Данное наблюдение будет особенно интересно стоматологам-ортопедам.

Представляется весьма перспективным использование в недалеком будущем разработанной сотрудниками Научного колледжа Университета Басры технологии выделения из плодов *Terminalia Chebula Retz.* биологически активных соединений, оказывающих противоопухолевый, антибактериальный и антиоксидантный эффекты.

Уделено внимание и проблеме нейроэндокринной патологии. Сотрудниками Самаркандского государственного медицинского университета в опытах на лабораторных животных показано, что формирование недостаточности функции щитовидной железы влечет за собой характерные патоморфологические изменения в головном мозге крыс. Представителями же научных коллективов Института медицины и здоровьесбережения Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина и Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова получены новые данные, раскрывающие особенности однократного влияния гамма-излучения на морфофункциональное состояние щитовидной железы организма лабораторных животных.

Надеемся, что представленные материалы окажутся востребованными не только специалистами клинической лабораторной диагностики, но и врачами-клиницистами в их практической и научной деятельности.

В преддверии наступающего 2025 года хотелось бы пожелать всем авторам и читателям нашего журнала крепкого здоровья, счастья и больших творческих успехов в практической и научной деятельности!

Главный редактор в Беларуси  
Владимир Семенович Камышников



**Заболевания органов репродуктивной системы / Высокотехнологичные лабораторные исследования**

*Назарова Г.Э., Аскерова Т.А., Гафаров И.А.*  
Диагностическая значимость показателей гормонального статуса при мужском бесплодии ..... 498

**Заболевания органов мочевыделительной системы / Оригинальные исследования**

*Зайцева Л.П., Надыров Э.А.*  
Ядрышковые организаторы (Nucleus organizers) обедненных клетками цитологических препаратов осадка мочи как информативный фактор дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря ..... 510

**Заболевания системы крови / Новые направления клинко-лабораторных исследований**

*Шпилук М.А., Белова К.В., Кречетова Л.В.*  
Применение двух тестов с разными методологическими принципами выявления волчаночного антикоагулянта значительно повышает эффективность прогнозирования тромботических осложнений в клинической практике ..... 520

**Клиническая инфектология и паразитология / Высокотехнологичные лабораторные исследования**

*Черновецкий М.А., Скоповец Е.Я., Агеев Н.В.*  
Молекулярно-генетическая диагностика инвазивных микозов у детей с онкогематологической патологией на основе этиологического анализа грибковой микрофлоры, циркулирующей в стационаре: технология и результаты исследования ..... 532

*Ярмухамедова Н.А., Мирзаева А.У., Акрамова Ф.Д., Шапоатов Р.К., Мусабев Э.И., Эргашова М.Я., Якубова Н.С., Азимов Д.А.*  
Молекулярно-биологический анализ риккетсиоза на территории Узбекистана ..... 549

**Нейроэндокринные расстройства / Экспериментальные исследования**

*Джурабекова А.Т., Насретдинова М.Т., Шомуродова Д.С., Камалова М.И.*  
Патоморфологические изменения ткани коры и субкортикальных отделов головного мозга у крыс при моделировании гипотиреоза нарушением кровоснабжения щитовидной железы ..... 560

*Черкасова Ю.Б., Соколова А.И., Панасенко С.В., Меньшова А.В., Савина А.О., Байрамова Н.А. кызы, Ярбалаева Г.К.*  
Оценка морфофункциональных изменений в состоянии межфолликулярной соединительнотканной стромы щитовидной железы после воздействия низкоинтенсивного гамма-излучения: экспериментальное исследование ..... 571

**Клиническая фармакология / Лабораторный мониторинг**

*Самира Ахмед Зеара, Фатима Сайван Сабах*  
Оценка противоопухолевого, антиоксидантного и антибактериального эффектов алкалоидного экстракта, выделенного из плодов Terminalia chebula Retz. .... 583

**Нефрология / Оригинальные исследования**

*Аль-Хафаджи Н.К., Аль-Омар Д.К.*  
Оценка функции почек и содержания тяжелых металлов в сыворотке крови пациентов с хронической болезнью почек до и после проведения гемодиализа ..... 598

**Стоматология / Экспериментальные исследования**

*Камил Н.Б., Аль-Габан Н.М.Х.*  
Оценка влияния экстракта листьев Moringa oleifera на процесс остеоинтеграции: экспериментальное исследование ..... 609

**Аллергология / Оригинальные исследования**

*Ирхайиф Р.А., Райсан С.Дж.*  
Значимость оценки коррелятивных изменений в уровнях общего IgE и IL-33 сыворотки крови при пищевой аллергии ..... 619

**Практикующему врачу / Новые направления клинко-лабораторных исследований**

*Дикая Т.В., Козлякова О.В., Артюшевская М.В., Сухарева А.П., Скурко И.А., Климович О.В., Заяц И.А., Цыганкова О.В.*  
Интегрированный подход к диагностике гемолитической болезни новорожденного по системе АВО: клинический случай ..... 625

**Diseases of the Reproductive System / High-Tech Laboratory Research**  
*Nazarova G., Askerova T., Gafarov I.*  
 Diagnostic Significance of Hormonal Status Assessment in Male Infertility .....499

**Diseases of the Urinary System / Original Researches**  
*Zaitsava L., Nadyrov E.*  
 Nucleus Organizers of Cell-Depleted Cytological Preparations of Urine Sediment as Informative Factor in Differential Diagnosis of Various Bladder Pathologies .....511

**Diseases of the Blood System / New Directions of Clinical and Laboratory Research**  
*Shpilyuk M., Belova Ch., Krechetova L.*  
 Using of Two Tests with Different Methodological Principles for Lupus Anticoagulant Detection Increases Significantly the Efficiency of Predicting Thrombotic Complications in Clinical Practice .....521

**Clinical Infectology and Parasitology / High-Tech Laboratory Research**  
*Tchernovetski M., Skapavets E., Aheyev N.*  
 Molecular Genetic Diagnosis of Invasive Mycoses in Children with Oncohematological Pathology Based on Etiologic Analysis of Inpatient Fungal Microflora: Study Technology and Results .....534

*Yarmukhamedova N., Mirzaeva A., Akramova F., Shapoatov R., Musabaev E., Ergashova M., Yakubova N., Azimov D.*  
 Molecular and Biological Analysis of Rickettsiosis in the Territory of Uzbekistan .....548

**Neuroendocrine Disorders / Experimental Researches**  
*Djurabekova A., Nasretdinova M., Shomurodova D., Kamalova M.*  
 Pathomorphological Changes in Cortical and Subcortical Tissue of the Brain in Rats in Modeling Hypothyroidism by Thyroid Blood Supply Impairment .....562

*Cherkasova Yu., Sokolova A., Panasenko S., Menshova A., Savina A., Bayramova N.A. kyzy, Yarbalaeva G.*  
 Evaluation of Morphofunctional Changes in Interfollicular Connective Tissue Stroma of the Thyroid Gland after Low-Intensity  $\gamma$ -Radiation Exposure: An Experimental Study .....572

**Clinical Pharmacology / Laboratory Monitoring**  
*Sameerah Ahmed Zeerah, Fatima Saiwan Sabah*  
 Estimation Anticancer, Antioxidant and Antibacterial Effect of Alkaloid Extract Isolated From Terminalia Chebula Retz. Fruits .....582

**Nephrology / Original Researches**  
*Al-Khafaji N.Q., Al-Khafaji B.Y., Al-Omar D.K.*  
 Evaluation of Kidney Functions and Heavy Elements Levels in the Blood Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Prior and After Hemodialysis .....597

**Dentistry / Experimental Researches**  
*Kamil N.B., Al-Ghaban N.M.H.*  
 Evaluation of Moringa Oleifera Leaves Extract Effect on Osseointegration: An Experimental Study .....608

**Allergology / Original Researches**  
*Irhayyif R.A., Raisan S.J.*  
 Significance of Assessing Correlative Changes in Total IgE and IL-33 Serum Levels in Food Allergy .....618

**To the Practitioner / New Directions of Clinical and Laboratory Research**  
*Dzikaya T., Kazliakova V., Artsiusheyskaya M., Sukhareva A., Skurko I., Klimovich V., Zayats I., Tsyhankova V.*  
 Integrated Approach to the Diagnosis of ABO Hemolytic Disease of Newborn: A Case Report .....626



Назарова Г.Э.✉, Аскерова Т.А., Гафаров И.А.  
Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан

## Диагностическая значимость показателей гормонального статуса при мужском бесплодии

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** интерпретация результатов, написание текста, обзор литературы и редактирование – Назарова Г.Э.; научное руководство, концепция и дизайн исследования, редактирование – Аскерова Т.А.; статистическая обработка данных – Гафаров И.А.

Подана: 11.04.2024

Принята: 01.10.2024

Контакты: xeyalcafarov4@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Традиционно используемые тесты клинико-лабораторной диагностики заболеваний, как правило, не обладают достаточно большой информативностью относительно ухудшения фертильных свойств эякулята, в связи с чем представляется актуальным определение диагностической значимости тех показателей, которые отражают эндокринный статус организма, нарушаемый при мужском бесплодии.

**Цель.** Оценка диагностической значимости и информативности показателей тестов на определение фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, пролактина и тестостерона при различных формах мужского бесплодия.

**Материалы и методы.** Проанализированы образцы крови и спермы 101 мужчины с идиопатическим мужским бесплодием, у 56 из которых наблюдалась астенозооспермия, у 30 – олигозооспермия, у 7 – обструктивная азооспермия, а у 8 – необструктивная азооспермия. Применены общепринятые методы морфологического исследования спермы, используемые для определения количества и оценки качества сперматозоидов в сперме. Концентрацию фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, тестостерона и пролактина в сыворотке крови пациентов определяли методами электрохемилюминесцентного иммуноанализа на автоанализаторе Roche e411.

**Результаты.** Установлены показатели диагностической информативности (диагностической чувствительности, диагностической специфичности и др.) тестов на гормональный статус организма при мужском бесплодии. Выявлено повышение концентрации фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, снижение уровня пролактина в сыворотке крови при олигозооспермии, повышение концентрации фолликулостимулирующего, лютеинизирующего гормонов и пролактина на фоне снижения уровня тестостерона при необструктивной азооспермии. Дана интерпретация результатов гормональных тестов при различных формах мужского бесплодия.

**Заключение.** Показано, что при всех исследованных формах мужского бесплодия наиболее высокой диагностической информативностью обладает тест на определение фолликулостимулирующего гормона.

**Ключевые слова:** мужское бесплодие, сперма, сперматозоиды, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, тестостерон, пролактин



Nazarova G.✉, Askerova T., Gafarov I.  
Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

## Diagnostic Significance of Hormonal Status Assessment in Male Infertility

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** results interpreting, text writing, literature review, and editing – Nazarova G.; scientific supervisor, study concept and design, editing – Askerova T.; statistical data processing – Gafarov I.

Submitted: 11.04.2024

Accepted: 01.10.2024

Contacts: xeyalcafarov4@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** Conventional clinical and laboratory tests, in most cases, are not sufficiently informative in terms of ejaculate fertile properties worsening assessment; therefore, it seems relevant to determine the diagnostic significance of parameters reflecting the endocrine status of the body disturbed in male infertility.

**Purpose.** To assess the diagnostic significance and informativeness of test indicators for determining follicle-stimulating hormones, luteinizing hormones, prolactin and testosterone in various forms of male infertility.

**Materials and methods.** Blood and semen samples from 101 men with idiopathic male infertility, 56 of whom had asthenozoospermia, 30 had oligozoospermia, 7 had obstructive azoospermia, and 8 had non-obstructive azoospermia were tested. Conventional methods of morphologic semen testing used for quantification and qualitative analysis of spermatozoa in semen were applied. Follicle-stimulating and luteinizing hormones, testosterone and prolactin blood serum levels were determined by electrochemiluminescence immunoassay using a Roche e411 autoanalyzer.

**Results.** Diagnostic informativeness indicators (diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, etc.) of tests assessing body hormonal status in male infertility were established. An increase in follicle-stimulating and luteinizing hormone levels and a decrease in prolactin level in blood serum in oligozoospermia, as well as an increase in follicle-stimulating and luteinizing hormone and prolactin levels against the background of a decrease in testosterone levels in non-obstructive azoospermia were revealed. Hormonal tests results in various forms of male infertility were interpreted.

**Conclusion.** It has been shown that in all studied forms of male infertility, the follicle-stimulating hormone test demonstrated the highest diagnostic informativeness.

**Keywords:** male infertility, follicle stimulating hormone, lutein stimulating hormone, testosterone, prolactin

### ■ ВВЕДЕНИЕ

12–15% всех супружеских пар в мире и около 50 миллионов мужчин страдают бесплодием, что приводит к глубоким психологическим, социальным и экономическим проблемам. Из-за бесплодия распадается 7,5% браков. Среди причин,

вызывающих бесплодие в браке, женский фактор составляет 40%, мужской – 40%, совместная роль обоих факторов выявляется в 20% случаев [1–3]. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что доля мужского фактора среди причин бесплодия с каждым годом увеличивается, а ослабление сперматогенной функции наблюдается у мужчин во всем мире [4]. В настоящее время с целью лабораторной диагностики мужского бесплодия используют показатели, характеризующие общую оплодотворяющую способность спермы, – концентрацию сперматозоидов, подвижность, долю сперматозоидов с нормальной морфологией [1, 5].

Несмотря на то что исследование спермограммы широко применяется в подавляющем большинстве клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений, оно не дает полной информации о нарушениях процесса сперматогенеза [6, 7]. В связи с этим остается актуальным изучение возможных причин патоспермии, в числе которых уменьшение количества сперматозоидов в результате нарушения их созревания, ослабление их подвижности или преобладание патологических сперматозоидов.

Наиболее тяжелой формой мужского бесплодия является азооспермия, встречающаяся в 10–15% случаев [2]. Принято различать обструктивную и необструктивную формы азооспермии. Необструктивная, или секреторная, азооспермия встречается чаще (в 80–90% случаев), чем обструктивная. Поскольку морфогенетические механизмы этиологии и патогенеза азооспермии до конца не известны, остаются трудности в ее лечении [3].

Современные методы диагностики форм мужского бесплодия в большинстве случаев не позволяют определить его причины. С этой точки зрения разработка новых диагностических программ на основе существующих тестов клиничко-лабораторного исследования может иметь большое значение в решении проблемы мужского бесплодия.

Около 20% случаев мужского бесплодия вызвано нарушением гормональной регуляции репродуктивной функции. Известно, что эндокринная система играет важную роль в формировании спермы [8, 9]. С целью оценки гормонального статуса мужчин, страдающих нарушением сперматогенеза, в сыворотке крови определялось содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), тестостерона и пролактина. Клинические наблюдения указывают на негативное влияние дисбаланса уровней тестостерона и гонадотропинов на продукцию спермы и репродуктивную функцию мужчин [3, 6].

Тестостерон является важным фактором индукции сперматогенеза и развития вторичных половых признаков, участвует в формировании мужских наружных половых и внутренних репродуктивных органов. Тестостерон имеет большое значение для качественного сперматогенеза, так как он участвует в регуляции гемато-тестикулярного барьера, мейоза, сертоли-сперматидной адгезии и высвобождения сперматозоидов [7]. Хотя тестостерон считается ключевым фактором сперматогенеза, количественное и качественное развитие этого процесса напрямую зависит от уровня ЛГ и ФСГ, секретлируемых передней долей гипофиза [6]. ЛГ и ФСГ вместе с высокой интратестикулярной концентрацией тестостерона играют важную роль в сперматогенезе, в формировании нормального объема спермы, фертильности у взрослого человека. ЛГ стимулирует синтез андрогенов (особенно тестостерона), весьма востребованных развивающимися эмбриональными клетками. ФСГ



усиливает действие тестостерона, обеспечивает функциональную активность клеток Сертоли в процессе сперматогенеза. Считается, что ФСГ способен регулировать сперматогенез даже при самом низком уровне интратестикулярного тестостерона [7].

Пролактин также играет важную роль в гормональной природе мужского бесплодия. Распространенность гиперпролактинемии при мужском бесплодии составляет 3–9%, а при идиопатической олигоспермии – 1–11%. У мужчин гиперпролактинемия вызывает снижение интереса к сексуальной жизни, эректильную дисфункцию, бесплодие. Функция пролактина в мужском организме долгое время не была известна, однако исследования последних лет показали, что этот гормон является регулятором половых функций и нормальной функциональной активности яичек у мужчин. Таким образом, пролактин оказывает синергетический эффект с тестостероном и ЛГ. Пролактин, как и другие гонадотропные гормоны, играет специфическую роль в созревании половых клеток, стимулируя секрецию и биосинтез половых гормонов [4, 9, 10].

В конечном итоге изменения уровней гормонов в организме могут приводить к нарушению сперматогенеза и мужскому бесплодию, однако диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность тестов на определение этих гормонов при мужском бесплодии изучены недостаточно.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка диагностической значимости и информативности показателей тестов на определение ФСГ, ЛГ, пролактина и тестостерона при различных формах мужского бесплодия.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы образцы крови и спермы 101 мужчины в возрасте 20–46 лет ( $31,6 \pm 0,5$  года) с идиопатическим мужским бесплодием. Количество и качество сперматозоидов в сперме оценивались методами исследования, традиционно используемыми в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Включение пациентов в исследование производилось на основании критериев, принятых Всемирной организацией здравоохранения в 2010 г. [5]. Все обследуемые были разделены на 3 группы по количеству и активности сперматозоидов: с астенозооспермией (56 пациентов с нормальным количеством сперматозоидов и низкой поступательной подвижностью), с олигозооспермией (30 пациентов с количеством сперматозоидов в 1 мл спермы  $< 15$  млн), с азооспермией (15 человек с отсутствием сперматозоидов в эякуляте). Пациенты группы азооспермии были разделены, в свою очередь, на 2 подгруппы: с обструктивной ( $n=7$ ) и необструктивной ( $n=8$ ) азооспермией. В контрольную группу вошли фертильные мужчины в возрасте 23–40 лет ( $n=20$ ;  $31,1 \pm 1,1$  года). По результатам анализа спермы количество сперматозоидов в контрольной группе составило 63,5 млн ( $Q_1=61,0$ ;  $Q_2=74,0$ ), в группе астенозооспермии – 45,0 млн ( $Q_1=61,0$ ;  $Q_2=74,0$ ), в группе олигозооспермии – 8,0 млн ( $Q_1=4,5$ ;  $Q_2=10,0$ ).

Концентрацию ЛГ, ФСГ, тестостерона и пролактина в сыворотке крови пациентов определяли методами электрохемилюминесцентного иммуноанализа на автоанализаторе Roche e411.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета программ SPSS-26 на основании t-критерия Стьюдента – Бонферрони и H-критерия Краскала – Уоллиса. Показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности гормональных тестов определяли на основе статистического анализа ROC (receiver operating characteristic). Интегральная оценка показателей диагностической чувствительности и диагностической специфичности характеризовала диагностическую ценность исследования. Если  $p < 0,05$ , гипотеза «0» отвергалась [11].

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании спермограммы выявлено уменьшение количества сперматозоидов в группе астенозооспермии на 41,1% ( $p < 0,001$ ), а в группе олигозооспермии – в 7,9 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. Между сопоставляемыми группами установлена статистически значимая разница и по количеству подвижных сперматозоидов ( $p < 0,001$ ). Количество подвижных сперматозоидов было меньше в группе олигозооспермии на 73,7% ( $p < 0,001$ ), а в группе астенозооспермии – в 3,7 раза ( $p_1 < 0,001$ ) по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. Как видно, общее количество сперматозоидов у мужчин с олигозооспермией уменьшилось в 5,6 раза ( $p < 0,001$ ), а количество подвижных сперматозоидов – в 2,1 раза ( $p_2 < 0,001$ ) по сравнению с таковым у мужчин с астенозооспермией.

В ходе исследования у мужчин групп бесплодия были выявлены гормональные нарушения. Так, концентрация ФСГ в сыворотке крови мужчин с астенозооспермией увеличилась на 57,7% по сравнению с аналогичным показателем у пациентов контрольной группы, при этом существенных изменений в концентрации ЛГ, тестостерона и пролактина не наблюдалось.

Концентрация ФСГ в сыворотке крови мужчин с олигозооспермией статистически достоверно повышалась в 2,4 раза ( $p_1 < 0,001$ ) по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы, концентрация ЛГ и тестостерона имела тенденцию к увеличению на 39,3% и 17,0% соответственно, а концентрация пролактина снизилась на 32%.

У мужчин с необструктивной азооспермией концентрация ФСГ увеличилась в 8,8 раза ( $p < 0,001$ ), ЛГ – в 2,9 раза ( $p < 0,001$ ), пролактина – на 89,0% по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе, а концентрация тестостерона оказалась сниженной на 22,9%.

Таким образом, у мужчин с необструктивной азооспермией по сравнению с мужчинами с обструктивной концентрация ФСГ, ЛГ и пролактина оказалась увеличенной в 4,2 раза ( $p < 0,001$ ), 2,2 раза ( $p = 0,033$ ) и на 43,4% соответственно. Концентрация ФСГ, ЛГ и пролактина у мужчин с необструктивной азооспермией была достоверно выше – в 3,7 раза ( $p < 0,001$ ), 2,1 раза ( $p < 0,001$ ) и 2,5 раза ( $p = 0,024$ ) соответственно по сравнению с соответствующими показателями у мужчин с олигозооспермией, а концентрация тестостерона снизилась на 43,4% (табл. 1).

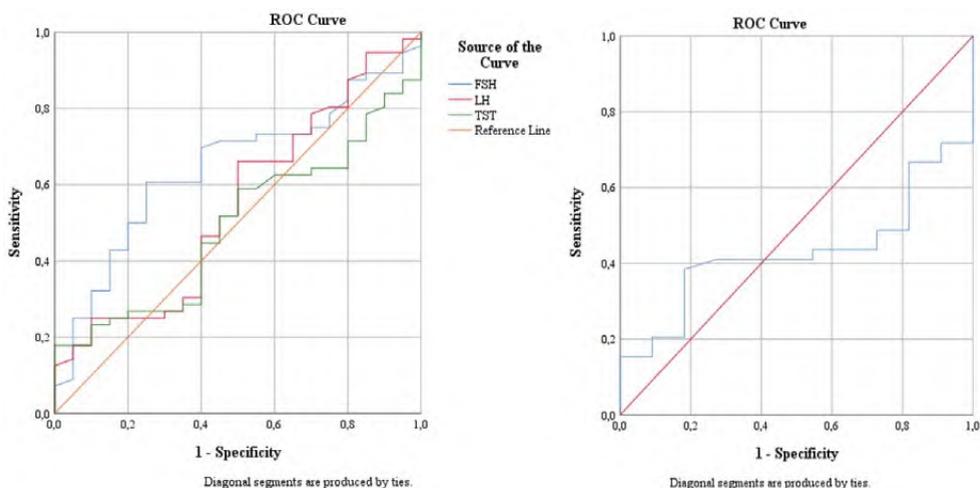
На основе статистического ROC-анализа определены показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности тестов на ФСГ, ЛГ, тестостерон и пролактин при различных формах мужского бесплодия. В группе астенозооспермии область специфичности ФСГ – площадь под кривой (AUC) – была



**Таблица 1**  
**Показатели концентрации ФСГ, ЛГ, тестостерона и пролактина в сыворотке крови при идиопатическом мужском бесплодии**  
**Table 1**  
**Changes in FSH, LH, testosterone and prolactin levels in idiopathic male infertility**

Показатели		Группы пациентов					P <sub>H</sub>
		Контроль (n=20)	Астено-зооспермия (n=56)	Олиго-зооспермия (n=30)	Азооспермия (необструкт.) (n=7)	Азооспермия (обструкт.) (n=8)	
Возраст, лет	M	31,1	31,4	32,5	31,4	30,8	0,862
	Me	31,5	30,0	32,5	31,0	29,5	
	Q <sub>1</sub>	28,0	27,5	28,0	23,0	27,0	
	Q <sub>2</sub>	34,0	35,0	35,0	38,0	35,0	
ФСГ, мЕд/мл	M	3,2	5,2	7,3	24,4	4,9	<0,001
	Me	2,6	4,1	6,2	22,8	5,4	
	Q <sub>1</sub>	2,1	2,2	4,0	17,5	3,4	
	Q <sub>2</sub>	3,8	5,7	10,0	32,7	6,1	
P <sub>1-4</sub>			p <sub>1</sub> =0,046	p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001 p <sub>3</sub> <0,001	p <sub>4</sub> <0,001		
ЛГ, мЕд/мл	M	3,3	3,9	4,3	8,3	4,6	0,001
	Me	2,8	3,0	3,9	8,2	3,7	
	Q <sub>1</sub>	2,1	2,3	2,9	5,6	3,1	
	Q <sub>2</sub>	4,5	4,6	5,3	9,2	5,6	
P <sub>1-4</sub>				p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001 p <sub>3</sub> =0,001	p <sub>4</sub> =0,033		
Тестостерон, ммоль/л	M	12,4	13,1	14,0	9,0	13,7	0,167
	Me	11,8	12,7	13,8	9,6	10,7	
	Q <sub>1</sub>	10,6	9,3	10,1	6,7	10,2	
	Q <sub>2</sub>	15,0	15,5	15,5	10,3	14,7	
Пролактин, мЕд/л	M	225,1	228,6	188,1	379,8	300,8	0,196
	Me	208,0	189,0	158,0	394,0	274,0	
	Q <sub>1</sub>	191,0	141,0	127,0	136,0	155,0	
	Q <sub>2</sub>	225,0	301,0	230,0	507,0	422,0	
P <sub>1-4</sub>				p <sub>3</sub> =0,024			

Примечания: M – среднее арифметическое; Me – медиана; Q1, Q2 – квартили. Статистическая достоверность разницы между показателями групп: p<sub>1</sub> – по сравнению с контролем; p<sub>2</sub> – по сравнению с пациентами с астенозооспермией; p<sub>3</sub> – по сравнению с пациентами с олигозооспермией; p<sub>4</sub> – по сравнению с пациентами с необструктивной азооспермией; P<sub>H</sub> – общее сравнение между всеми группами.



**Рис. 1. ROC-кривые оценки диагностической надежности тестов на определение гормонов в группе пациентов с астенозооспермией**  
**Fig. 1. ROC curves for assessing the diagnostic reliability of hormones in the asthenozoospermia group**

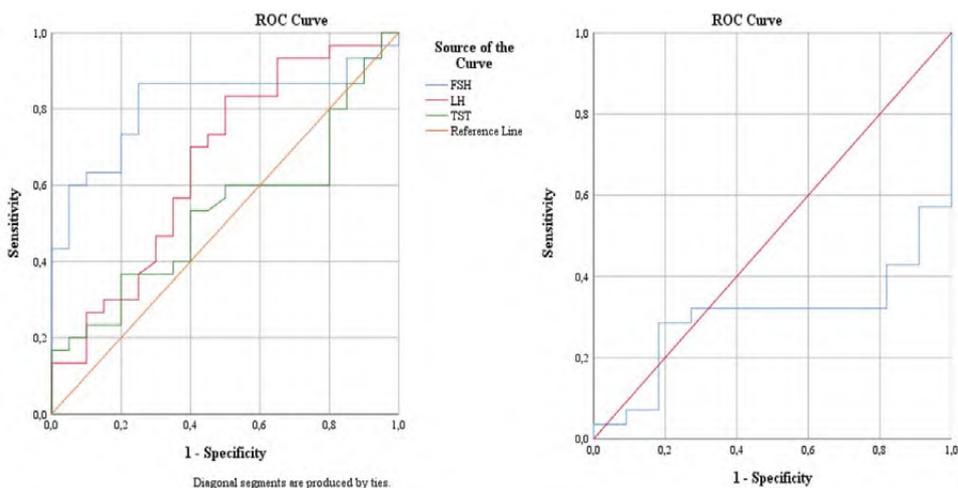
большей среди гормональных показателей (0,645), незначительно приближаясь к статистической целостности ( $p=0,055$ ) (рис. 1, табл. 1). В этой группе для теста на определение уровня ФСГ при cut-off point  $>3,56$  мЕд/мл диагностическая чувствительность составила  $60,7 \pm 6,5\%$ , диагностическая специфичность –  $75,0 \pm 9,7\%$ , общая диагностическая ценность (ОДЦ) –  $64,5 \pm 5,5\%$  (табл. 2).

По результатам ROC-анализа показатели оценки диагностической надежности теста на определение ФСГ в группе пациентов с олигозооспермией ( $AUC=0,813$ ;  $p<0,001$ ) при cut-off point  $>3,63$  мЕд/мл составили: диагностическая чувствительность –  $86,7 \pm 6,2\%$ , диагностическая специфичность –  $75,0 \pm 9,7\%$ , ОДЦ –  $82,0 \pm 5,4\%$ .

При пороге ЛГ (cut-off point) 2,66 мЕд/мл диагностическая чувствительность теста на определение гормона равнялась  $83,3 \pm 6,8\%$ , диагностическая специфичность –  $50,0 \pm 11,2\%$ , ОДЦ –  $70,0 \pm 6,5\%$ . В этой группе порог отсечения пролактина (cut-off point) составил 189,0 мЕд/л, показатель диагностической чувствительности –  $67,9 \pm 8,8\%$ , диагностической специфичности –  $81,8 \pm 11,6\%$ , ОДЦ –  $71,8 \pm 7,2\%$  (рис. 2, табл. 3).

**Таблица 2**  
**Показатели площади ROC-кривой гормонов в группе пациентов с астенозооспермией**  
**Table 2**  
**Hormones ROC curve area values in the asthenozoospermia group**

Показатели тестов	Площадь (AUC)	Стандартная ошибка	Р-достоверность	95% доверительный интервал	
				Нижний предел	Верхний предел
ФСГ	0,645	0,067	0,055	0,514	0,776
ЛГ	0,547	0,075	0,536	0,399	0,695
Тестостерон	0,492	0,069	0,920	0,356	0,629
Пролактин	0,430	0,081	0,482	0,272	0,589

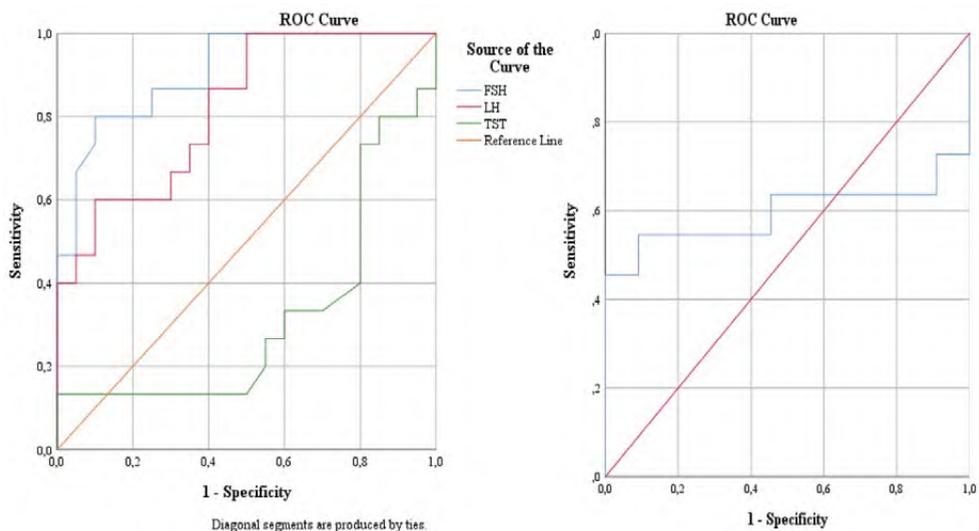


**Рис. 2. ROC-кривые оценки диагностической надежности тестов на определение гормонов в группе пациентов с олигозооспермией**  
**Fig. 2. ROC curves for assessing the diagnostic reliability of hormone tests in the oligozoospermia group**

Как следует из рассмотрения представленных данных, использование теста на определение пролактина может иметь практическое значение. В группе пациентов с азооспермией данные оценки диагностической надежности теста на определение гормонов составили: для ФСГ  $AUC=0,908$  ( $p<0,001$ ) и для ЛГ  $AUC=0,820$  ( $p=0,001$ ), что отражает высокую диагностическую надежность исследования. Для ФСГ cut-off point составила 4,95 мЕд/мл, диагностическая чувствительность –  $80,0\pm 10,3\%$ , диагностическая специфичность –  $90,0\pm 6,7\%$ , ОДЦ –  $85,7\pm 5,9\%$ . Для ЛГ cut-off point – 5,26 мЕд/мл, диагностическая чувствительность –  $60,0\pm 12,6\%$ , диагностическая специфичность –  $90,0\pm 6,7\%$ , ОДЦ –  $77,1\pm 7,1\%$ . При азооспермии для теста на определение тестостерона показатели диагностической надежности составили: cut-off point  $<10,5$  ммоль/л, диагностическая чувствительность –  $60,0\pm 12,6\%$ , диагностическая специфичность –  $80,0\pm 8,9\%$ , ОДЦ –  $71,4\pm 7,6\%$  (рис. 3, табл. 4).

**Таблица 3**  
**Показатели площади ROC-кривой гормонов в группе пациентов с олигозооспермией**  
**Table 3**  
**Hormones ROC curve area values in the oligozoospermia group**

Показатели тестов	Площадь (AUC)	Стандартная ошибка	Р-достоверность	95% доверительный интервал	
				Нижний предел	Верхний предел
ФСГ	0,813	0,063	0,000	0,690	0,936
ЛГ	0,659	0,081	0,059	0,500	0,818
Тестостерон	0,531	0,083	0,714	0,369	0,693
Пролактин	0,302	0,084	0,057	0,138	0,466



**Рис. 3. ROC-кривые оценки диагностической надежности тестов на определение гормонов в группе пациентов с азооспермией**  
**Fig. 3. ROC curves for assessing the diagnostic reliability of hormone tests in the azoospermia group**

**Таблица 4**  
**Показатели площади ROC-кривой гормонов в группе пациентов с азооспермией**  
**Table 4**  
**Hormones ROC curve area values in the azoospermia group**

Показатели тестов	Площадь (AUC)	Стандартная ошибка	P-достоверность	95% доверительный интервал	
				Нижний предел	Верхний предел
ФСГ	0,908	0,048	0,000	0,813	1,000
ЛГ	0,820	0,070	0,001	0,683	0,957
Тестостерон	0,318	0,098	0,069	0,127	0,509
Пролактин	0,595	0,139	0,450	0,323	0,867

Таким образом, в диагностике олигозооспермии тест на определение ФСГ имеет высокую диагностическую специфичность и диагностическую чувствительность, а на определение ЛГ – высокую диагностическую чувствительность. При необструктивной азооспермии тесты на определение ФСГ и ЛГ обладают высокой диагностической специфичностью и диагностической чувствительностью и могут иметь важное диагностическое значение. В то же время и констатация снижения уровня тестостерона имеет практическое значение в диагностике азооспермии, так как в этой группе показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста на определение тестостерона повышены.



## ■ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из полученных результатов, у пациентов с астенозооспермией системных эндокринных нарушений не регистрировалось (по сравнению с контингентом фертильных мужчин), лишь значительно повышалась концентрация ФСГ. В крови мужчин с олигозооспермией повышалась концентрация ФСГ и ЛГ, а пролактин – снижалась. В этой группе статистически достоверный результат констатирован только для ФСГ.

У мужчин с азооспермией концентрации ФСГ, ЛГ и пролактина были увеличены по сравнению с данными контрольной группы. Это увеличение было статистически значимым, причем наибольшее возрастание наблюдалось у мужчин с необструктивной азооспермией. В обеих группах мужчин с азооспермией уровень тестостерона имел тенденцию к снижению, особенно выраженную при необструктивной форме.

Судя по ROC-кривым, тест на определение ФСГ обладает высокой диагностической чувствительностью и диагностической специфичностью в отношении выявления астенозооспермии; вместе с тем его можно считать практически важным только в силу свойственной ему диагностической специфичности.

Использование теста на определение ФСГ имеет большое практическое значение в диагностике олигозооспермии в связи с проявлением им его высокой диагностической чувствительности и ОДЦ.

Благодаря высокой диагностической чувствительности и специфичности тест на определение пролактина можно считать важным в диагностике олигозооспермии. Следует отметить, что тест на определение ЛГ как специфический показатель в диагностике олигозооспермии не имеет практического значения. Снижение концентрации тестостерона при азооспермии также можно считать значимым с диагностической точки зрения. Известно, что если необструктивная азооспермия обусловлена нарушением процесса сперматогенеза, то обструктивная азооспермия – обструкцией семенных протоков. В связи с этим следует полагать, что формы эндокринной патологии играют важную роль в этиологии необструктивной азооспермии и приводят к нарушению сперматогенеза [7].

При трактовке полученных результатов нужно иметь в виду, что если выработка спермы в яичках снижается, то синтез ФСГ в гипофизе увеличивается с целью восстановления нормальной функции яичек. Таким образом, высокий уровень ФСГ указывает на нарушение формирования сперматозоидов.

Нормальные концентрации тестостерона, ФСГ и ЛГ позволяют предположить посттестикулярную форму азооспермии, обусловленную преимущественно обструкцией и повреждением семенных канальцев, ретроградной эякуляцией и др. При нормальном или несколько пониженном уровне тестостерона высокие концентрации ФСГ и ЛГ являются признаками первичного гипогонадизма, указывая на первичную тестикулярную форму, приводящую к функциональному нарушению сперматогенеза и состояния клеток Лейдига [7, 12, 13].

Нормальный или слегка повышенный уровень ФСГ не может в полной мере свидетельствовать о нарушении сперматогенеза либо о наличии или отсутствии обструкции, так как при нарушении сперматогенеза уровень ФСГ возрастает примерно в 2 раза:  $11,45 \pm 14,02$  мЕд/мл против  $47,09 \pm 1,62$  мЕд/мл [3, 4, 14]. Полученные нами результаты показывают, что уровень ФСГ у пациентов с олигозооспермией несколько

повышен, но значительно ниже, чем у пациентов с необструктивной азооспермией. Это дает основания считать, что при олигозооспермии количество сперматозоидов в эякуляте уменьшается в результате частичного нарушения сперматогенеза. ФСГ и ЛГ в высоких концентрациях влияют на состояние гипоталамо-гипофизарной оси, следствием чего может наблюдаться гипоталамо-гипофизарное воздействие по принципу обратной связи, приводящее к снижению уровня тестостерона. При азооспермии и олигозооспермии на фоне высоких уровней ФСГ и ЛГ концентрация тестостерона снижается или остается нормальной, что свидетельствует о нарушении сперматогенеза у этих пациентов [4].

Результаты выполненного исследования показали, что гиперпролактинемия может играть важную роль в этиологии мужского бесплодия, особенно азооспермии. Пролактин секретируется гипофизом и способен замедлять синтез ФСГ, ЛГ и тестостерона за счет ослабления пульсирующей секреции рилизинг-факторов в гипоталамусе по принципу обратной связи, что может быть одной из основных причин нарушения сперматогенеза, снижения подвижности сперматозоидов и образования сперматозоидов с аномальным морфологическим строением [4, 10, 15]. По результатам ROC-анализа снижение уровня пролактина может быть одним из предикторов олигозооспермии [4].

Таким образом, ФСГ, ЛГ, пролактин и тестостерон являются биохимическими маркерами сперматогенеза и фертильности, а использование тестов на эти гормоны может иметь большое практическое значение в определении течения и оценке индивидуального прогноза мужского бесплодия.

## ■ ВЫВОДЫ

1. Повышение концентраций ФСГ и ЛГ, а также снижение уровня пролактина могут быть показателями олигозооспермии.
2. Высокие концентрации ФСГ, ЛГ и пролактина у мужчин с азооспермией следует считать одними из важных показателей в диагностике необструктивной азооспермии.
3. Согласно данным, полученным с использованием ROC-анализа, тест на определение ФСГ проявляет наиболее высокую диагностическую надежность при исследовании пациентов с мужским бесплодием.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Chalyi M.E., Akhvediani N.D., Kharchilava R.R. Male infertility. *Urologiia*. 2017;(52):4–19. doi: <https://dx.doi.org/10.18565/urologiia> (in Russian)
2. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., et al. Male infertility. *Lancet*. 2021 Jan 23; 397(10271):319–333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2
3. Ishrat S., Debnath M., Shamim A.K.S., et al. Endocrine and Sonographic Evaluation of Severe Male Factor Infertility: A Descriptive Analysis. *Sch Int J Obstet Gynec*. 2021;4(5):214–220. doi: 10.36348/sijog.2021.v04i05.008
4. Gangwar P.K., Sankhwar S.N., Pant S., et al. Increased Gonadotropins and prolactin are linked to infertility in males. *Bioinformation*. 2020;16(2):176–182. doi: 10.6026/97320630016176
5. World Health Organization (2010). *Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. Geneva: World Health Organization.
6. Shirshov V.N. Current state of the male infertility problem: the review of european association of urology clinical guidelines. *Clinical practice*. 2016;1(25):39–50. (in Russian)
7. Livingston M., Heald A.H. Adult Male Hypogonadism: A Laboratory Medicine Perspective on Its Diagnosis and Management. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Dec 12;13(24):3650. doi: 10.3390/diagnostics13243650
8. Simchenko N.I., Anashkina E.E., Bykova O.O. Hormonal causes of male infertility. *Reproductive health. Eastern Europe*. 2017;7:504–505. (in Russian)



9. Sengupta P, Dutta S., Karkada I.R., et al. Endocrinopathies and Male Infertility. *Life (Basel)*. 2021 Dec 22;12(11):10. doi: 10.3390/life12010010
10. Raut S., Deshpande S., Balasinar N.H. Unveiling the Role of Prolactin and its Receptor in Male Reproduction. *Horm Metab Res*. 2019;51:215–219. doi: 10.1055/a-0859-1144
11. Gafarov I.A. (2022) *Biostatistics*. Baku: Tebib. (in Azerbaijan)
12. Mamdooh A.N., Ramadan A.R., Zahraa A. Effect of Obesity, FSH, LH, Prolactin and Testosterone hormones levelsoninfertile patients. *International journal of Pharmaceutical Research*. 2020;12(2):1102–1106. doi: 10.31838/ijpr/2020
13. Oduwole O.O., Peltoketo H., Huhtaniemi I.T. Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;14(9):763. doi: 10.3389/fendo.2018.00763
14. Jankowska K., Suszczewicz N., Rabijewski M., et al. Inhibin-B and FSH Are Good Indicators of Spermatogenesis but Not the Best Indicators of Fertility. *Life (Basel)*. 2022 Mar 30;12(4):511. doi: 10.3390/life12040511
15. Kim T.J., Koo K.C. Testosterone to Luteinizing Hormone Ratio as a Potential Predictor of Sperm Retrieval in Non-Obstructive Azoospermia Patients. *Yonsei Med J*. 2023 Jul;64(7):433–439. doi: 10.3349/ymj.2023.0054



Зайцева Л.П.<sup>1</sup>✉, Надыров Э.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Гомельский областной клинический онкологический диспансер, Гомель, Беларусь

<sup>2</sup> Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

## Ядрышковые организаторы (Nucleus organizers) обедненных клетками цитологических препаратов осадка мочи как информативный фактор дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – Зайцева Л.П.; редактирование, проверка критически важного содержания, утверждение рукописи материалов статьи для публикации – Надыров Э.А.

Подана: 11.09.2024

Принята: 11.11.2024

Контакты: larysazaitsava2802@gmail.com

### Резюме

**Введение.** Традиционно осуществляемое цитологическое исследование гипоцеллюлярных препаратов осадка мочи связано с потенциальным риском возникновения ложноположительных либо ложноотрицательных результатов, что заставляет изыскивать дополнительные критерии дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря.

**Цель.** Определить количественные и качественные морфологические параметры ядрышковых организаторов в гипоцеллюлярных цитологических препаратах осадка мочи при отдельных формах патологии мочевого пузыря.

**Материалы и методы.** Исследовано 600 уротелиальных клеток, окрашенных нитратом серебра, с использованием программы Motic Images Advanced 3.2, позволяющей проводить измерения в полуавтоматическом режиме количества ядрышковых организаторов (в том числе и мелкодисперсных зон), занимаемой ими площади в ядре и процентного (%) соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра клетки.

**Результаты.** Показано, что рост степени злокачественности статистически значимо взаимосвязан с площадью ядрышковых организаторов ( $r_s=0,442$ ,  $p<0,0001$ ), с процентным выражением соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра ( $r_s=0,598$ ,  $p<0,0001$ ) и с количеством ядрышковых организаторов ( $r_s=0,769$ ,  $p<0,0001$ ). Наибольшая площадь ядрышковых организаторов была установлена для уротелиальной карциномы High grade, которая в 2,4 раза превышала аналогичный показатель при реактивных изменениях ( $p<0,0001$ ) и в 1,7 раза – при уротелиальной карциноме Low grade ( $p<0,0001$ ). Показатель процентного соотношения площади ядрышковых организаторов к площади ядра имел максимальные значения при уротелиальной карциноме High grade и превышал аналогичный показатель при реактивных изменениях в 2,6 раза ( $p<0,0001$ ) и уротелиальной карциноме Low



grade – в 2 раза ( $p < 0,0001$ ). Количество ядрышковых организаторов на ядро клетки было максимальным при уротелиальной карциноме High grade и превышало аналогичные значения при уротелиальной карциноме Low grade в 1,83 раза ( $p < 0,0001$ ) и реактивных изменениях в 2,75 раза ( $p < 0,0001$ ). При уротелиальной карциноме Low grade количество ядрышковых организаторов на ядро клетки было в 1,5 раза выше в сравнении с реактивными изменениями ( $p < 0,0001$ ).

**Заключение.** Для повышения надежности цитологического метода исследования в дифференциальной диагностике патологических изменений мочевого пузыря на дооперационном этапе необходимо оценивать ядрышковые организаторы, окрашивая цитологические препараты осадка мочи реагентом с нитратом серебра. Возрастание значений морфометрических параметров ядрышковых организаторов (площадь ядрышковых организаторов, процентного соотношения площади ядрышкового организатора к площади ядра, количество ядрышковых организаторов) отражает увеличение пролиферативной активности клеток при их злокачественной трансформации. Окраска ядрышковых организаторов нитратом серебра является простым в исполнении, не требующим больших материальных затрат методом и может быть использована как альтернатива сложному и дорогостоящему иммуноцитохимическому методу исследования при оценке пролиферативной активности клеток.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, цитологическое исследование, гипоцеллюлярный осадок мочи, дифференциальная диагностика, ядрышковые организаторы

Zaitsava L.<sup>1</sup>✉, Nadyrov E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Gomel, Belarus

<sup>2</sup> Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

## Nucleus Organizers of Cell-Depleted Cytological Preparations of Urine Sediment as Informative Factor in Differential Diagnosis of Various Bladder Pathologies

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study concept and design, material collecting, processing, text writing – Zaitsava L.; editing, critical content checking, manuscript approval for publication – Nadyrov E.

Submitted: 11.09.2024

Accepted: 11.11.2024

Contacts: larysazaitsava2802@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** Conventional cytological tests of hypocellular urine sediments are associated with a potential risk of false-positive or false-negative results, forcing to search for further criteria for differential diagnosis of various bladder pathologies.

**Purpose.** To determine quantitative and qualitative morphological parameters of nucleus organizers in hypocellular cytological preparations of urine sediment in some bladder pathologies.

**Materials and methods.** 600 urothelial cells stained with silver nitrate were analyzed using the Motic Images Advanced 3.2 software allowing semi-automatic nucleus organizers

(including finely dispersed zones) quantification, as well as their area in the nucleus and the ratio (%) of their area to that of the cell nucleus measurement.

**Results.** It was shown that the increase in malignancy grade correlated statistically significantly with the area of nucleus organizers ( $r_s=0.442$ ,  $p<0.0001$ ), with the percent ratio of nucleus organizers area to nucleus area ( $r_s=0.598$ ,  $p<0.0001$ ), and with the number of nucleus organizers ( $r_s=0.769$ ,  $p<0.0001$ ). The largest area of nucleus organizers was identified in high grade urothelial carcinoma, and it was 2.4-fold higher than that in reactive changes ( $p<0.0001$ ) and 1.7-fold higher than that in low grade urothelial carcinoma ( $p<0.0001$ ). The percent ratio of nucleus organizers area to the nucleus area showed maximum values in high grade urothelial carcinoma and was 2.6-fold higher ( $p<0.0001$ ) than in reactive changes and 2-fold higher ( $p<0.0001$ ) than in low grade urothelial carcinoma. The number of nucleus organizers per cell nucleus was maximal in high-grade urothelial carcinoma and exceeded similar values in low grade urothelial carcinoma by 1.83-fold ( $p<0.0001$ ) and reactive changes by 2.75-fold ( $p<0.0001$ ). In low grade urothelial carcinoma, the number of nucleus organizers per cell nucleus was 1.5-fold higher than in reactive changes ( $p<0.0001$ ).

**Conclusion.** To increase the reliability of cytology method in differential diagnosis of bladder pathological changes at preoperative stages, an evaluation of nucleus organizers is required by staining cytological preparations of urine sediment with silver nitrate reagent. Increasing values of morphometric parameters of nucleus organizers (area of nucleus organizers, percent ratio of nucleus organizer area to nucleus area, and nucleus organizers number) indicate an increase in cells proliferative activity in their malignant transformation. Silver nitrate staining of nucleus organizers is easy to perform and not requiring large material costs method, and can be used as an alternative to complicated and expensive immunocytochemical test method in assessing cells proliferative activity.

**Keywords:** bladder cancer, cytological examination, hypocellular urine sediment, differential diagnosis, nucleus organizers

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) остается важнейшей проблемой в структуре общей онкологической заболеваемости и составляет 3,1% всех злокачественных образований во всем мире. РМП является 13-м по частоте диагностируемым видом рака, с 614 тыс. вновь выявленных случаев рака и 220 тыс. смертей, произошедших в 2022 году [1]. По данным Белорусского канцер-регистра, в 2020 году в Беларуси был выявлен 1071 новый случай РМП, стандартизованный показатель заболеваемости составил 6,0 на 100 000 населения, у мужчин – 12,5, у женщин – 1,9 на 100 000 населения. Выявляемость по стадиям заболевания составила: I–II – 81,3%, III – 9,0%, IV – 7,8% [2]. Цитологическое исследование клеточного осадка мочи в Республике Беларусь включено в алгоритм диагностики и лечения РМП и применяется в качестве дополнительного метода исследования при первичном обследовании и как основной метод при наблюдении за пациентами, страдающими РМП [3].

Для улучшения взаимодействия между патологоанатомами, цитологами (врачами клинической лабораторной диагностики) и урологами в 2016 году было опубликовано первое издание Парижской системы отчетности для стандартизации



заклучений цитологического исследования мочи (TPSRUC, Парижская система [TPS] 1.0). После 5–6 лет практики на основе критериев TPS 1.0 и проспективных исследований в 2022 году вышло второе издание (TPS 2.0) [4].

TPS 2.0 состоит из шести диагностических категорий: неинформативный материал (ND), отсутствие уротелиальной карциномы высокой степени злокачественности (NHGUC), атипичные уротелиальные клетки (AUC), подозрение на уротелиальную карциному высокой степени злокачественности (SHGUC), уротелиальная карцинома высокой степени злокачественности (HGUC) и другие злокачественные новообразования. При этом заключение об уротелиальной карциноме низкой степени злокачественности (LGUC) было отнесено к категории NHGUC – в связи с низкой диагностической чувствительностью в выявлении LGUC (21–53%) [5]. Основной целью TPS является: снижение процента неопределенных категорий (AUC) и сосредоточение на точной идентификации HGUC, что обеспечивает наивысшую диагностическую специфичность и диагностическую чувствительность в определении HGUC [4].

TPS 1.0 и 2.0 определили, что для постановки заключения HGUC в нижних и верхних мочевых путях достаточно более 5–10 недегенерированных, неповерхностных уротелиальных клеток с морфологическими признаками злокачественности (HGCs), которыми являются: гиперхромия ядра, неровный контур ядерной мембраны, хроматин грубой структуры и главный диагностический ориентир – ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦС) –  $\geq 0,5$  – «увеличенное»,  $\geq 0,7$  – «высокое», также могут присутствовать видимые нуклеолы, плотная или вакуолированная цитоплазма, митозы, некроз [6]. Этот количественный параметр (5–10 клеток HGCs) до недавнего времени оставался спорным, однако исследованиями Momin T. Siddiqui et al., 2023, было подтверждено, что современный критерий TPS, предусматривающий наличие  $\geq 5$  клеток HGCs в нижних отделах тракта, является надежным с риском развития злокачественной опухоли высокой степени (ROHM), равным 100%. Постановка же диагноза HGUC при наличии  $< 5$  клеток HGCs сопряжена с риском снижения ROHM [7].

Следует отметить, что цитологическая интерпретация осадка мочи может быть затруднена в гипоцеллюлярных препаратах (5–10 клеток), из-за инфекций мочевыводящих путей, камней или внутрипузырных инстилляций; по данным зарубежной литературы, специфичность метода также зависит и от квалификации врача [8]. Предоставление ложноположительного цитологического заключения при низкой клеточности образца мочи приводит к неверным диагностическим решениям.

Для повышения диагностической надежности использования цитологического метода в установлении форм патологии мочевого пузыря предложено применить дополнительный метод исследования – окрашивание цитологических препаратов осадка мочи нитратом серебра для выявления ядрышковых организаторов.

Ядрышковые организаторы (англ. Nucleolus organizer regions, NOR) – участки хромосом, образующие внутри ядра клетки ядрышко. У человека ЯО представлены участками, расположенными на коротких плечах акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21, 22 и содержащими гены 45S рPHK – предшественника 5.8S, 18S, 28S рPHK [9].

Известно, что при трансформации нормальных клеток в опухолевые уровень ЯО в них меняется в сторону повышения, появляется специфическая морфологическая картина и в самих ЯО, и в ядрышках в целом. Данные изменения отражают пролиферативную активность опухолевых клеток и служат объективным маркером злокачественности [9].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить количественные и качественные морфологические параметры ядрышковых организаторов в гипоцеллюлярных цитологических препаратах осадка мочи при отдельных формах патологии мочевого пузыря.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом анализа являлись гипоцеллюлярные цитологические препараты осадка мочи, приготовленные методами жидкостной цитологии и цитоцентрифугирования и окрашенные по Романовскому – Гимзе. Исследование проводилось на базе централизованной цитологической лаборатории учреждения «Гомельский областной клинический онкологический диспансер».

На дооперационном этапе цитологические заключения были сформулированы с учетом положений TPS 2.0:

- NHGUC (реактивные изменения уротелия) – 25 препаратов (из них 5 соответствовали гистологически верифицированному циститу, в остальных 20 случаях необходимости проведения гистологического исследования не было, так как по результатам визуализирующих методов исследования (КТ, УЗИ) объемная и пристеночная патология не была установлена);
- AUC (атипичные клетки уротелия, в том числе и реактивная атипия) – 21 случай, гистологически верифицированы 17 случаев, из них: уротелиальная карцинома *in situ* – 1, уротелиальная карцинома Low grade – 12, уротелиальная карцинома High grade – 4, в 4 случаях гистологического исследования не было;
- SHGUC – 15 случаев, из них в 2 случаях гистологически верифицировали уротелиальную карциному *in situ*, в 8 – уротелиальную карциному Low grade, в 4 – уротелиальную карциному High grade, в 1 случае гистологического исследования не было;
- HGUC – 35 случаев, из них гистологически верифицировали цистит с участками дисплазии в 3 случаях, уротелиальную карциному *in situ* – 5, уротелиальную карциному Low grade – 10, уротелиальную карциному High grade – 11, в 4 случаях гистологического исследования не было.

Далее по результатам гистологического исследования с верифицированной степенью дифференцировки опухоли (или ее отсутствием) ретроспективно были отобраны соответствующие гипоцеллюлярные цитологические препараты (n=96) и дополнительно окрашены нитратом серебра.

В исследовании использовался импрегнационный метод выявления ЯО в ядрах клеток, предложенный Коржевским Д.Э. в 1995 году, который заключался в следующем: исследуемый материал фиксировали в 96% этаноле в течение 10 минут, далее препарат высушивали на воздухе. После полного высыхания препарат погружали в дистиллированную воду на 1 минуту. Затем на исследуемую зону наконечником наносили 2 объема 50% раствора серебра и 1 объем раствора желатина с муравьиной кислотой. Растворы незамедлительно перемешивали, накрывали покровным стеклом и помещали их на 7–15 минут в темное место. Далее препараты промывали в трех порциях дистиллированной воды по 1–2 мин. При необходимости контрастирования фон препарата подкрашивали [10].

В результате реакции серебрения в ядре определялись ЯО в виде зерен коричнево-черного цвета различных размеров и форм – место контакта серебра в клетке с соответствующими кислотными белками транскрипции и трансформации рРНК [11].

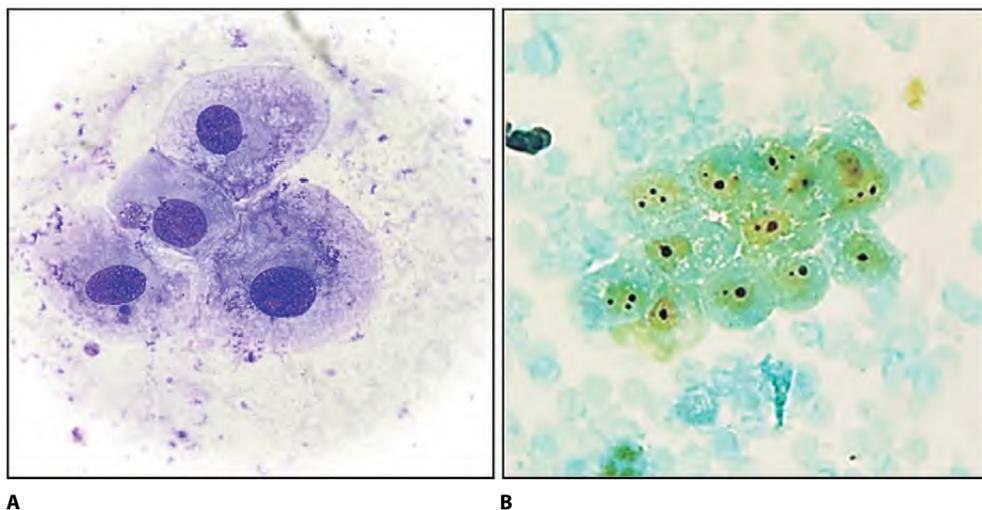


При помощи системы Motic Easy Scan препараты были отсканированы, и программой Motic Images Advanced 3.2 полуавтоматически проведена оценка морфофункциональных особенностей ЯО. На примере 600 уротелиальных клеток были измерены следующие параметры: площадь ядра клетки, количество объектов ЯО (в том числе и мелкодисперсных зон), занимаемая ими площадь в ядре и % соотношения площади ЯО к площади ядра клетки. Статистическую обработку проводили с использованием пакета статистических программ Graph Pad Prism 8.3. Проверка нормальности распределения проводилась с использованием критерия Шапиро – Уилка. Числовые данные отличались от закона нормального распределения, и результаты были представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха  $[Q^1-Q^3]$ . Сравнительный анализ проводился с использованием критерия Манна – Уитни. Корреляционный анализ проводился с использованием критерия Спирмена ( $r_s$ ).

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

NHGUC (в том числе реактивные изменения уротелия) при окраске по Романовскому – Гимзе характеризовались отсутствием признаков атипии в поверхностных клетках уротелия, отмечались вакуолизация цитоплазмы, равномерное перераспределение хроматина в ядре (рис. 1А). При окраске нитратом серебра в промежуточных клетках уротелия определялись немногочисленные крупные по размерам ЯО, с четким, ровным контуром. При этом в клетках также отсутствовали признаки атипии (рис. 1В).

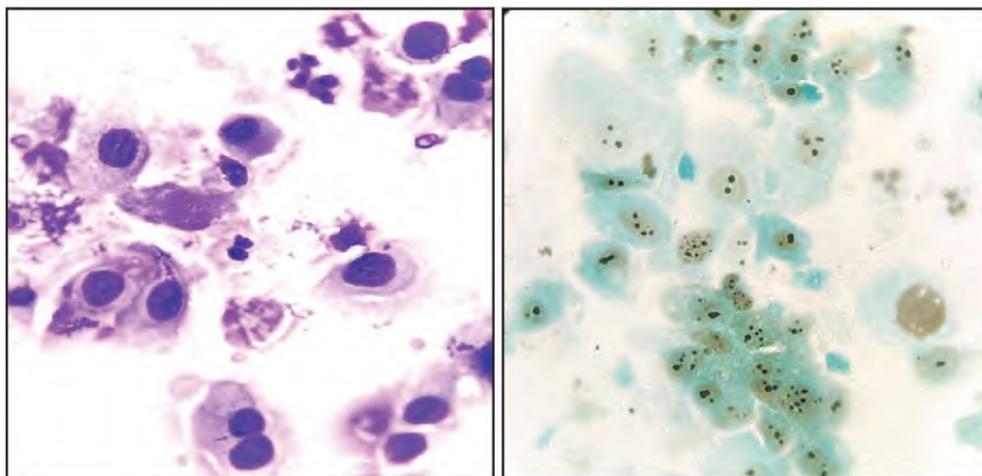
Так как карцинома LGUC по классификации TPS 2.0 добавлена в категорию NHGUC в связи с низкой диагностической чувствительностью в ее выявлении, связанной



**Рис. 1.** Цитологический препарат клеточного осадка мочи с признаками реактивных изменений, NHGUC, увеличение  $\times 1000$ . А – окраска по Романовскому – Гимзе; В – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen

**Fig. 1.** Cytological preparation of urine cell sediment with signs of reactive changes, NHGUC, magnification  $\times 1000$ . А – Romanovsky – Giemsa staining; В – silver nitrate staining, Fastgreen background staining

Ядрышковые организаторы (Nucleus organizers) обедненных клетками цитологических препаратов осадка мочи как информативный фактор дифференциальной диагностики различных форм патологии мочевого пузыря

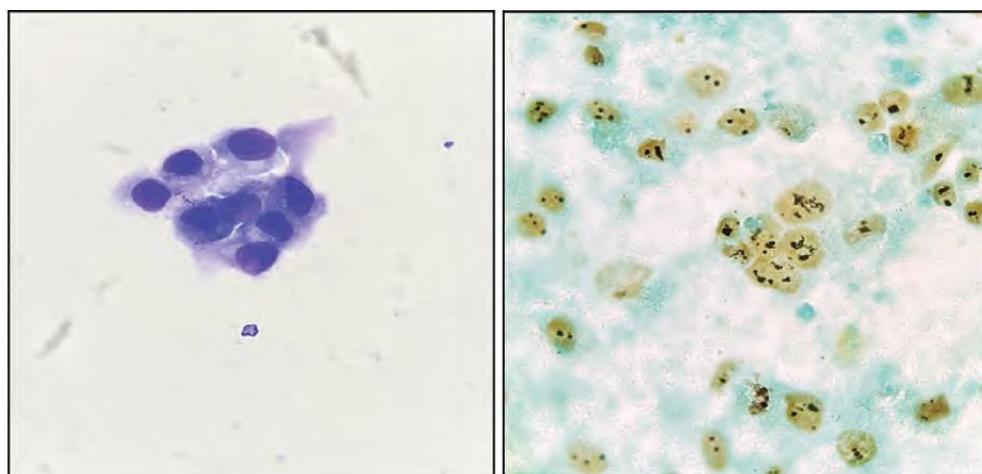


**A**

**B**

**Рис. 2.** Цитологический препарат клеточного осадка мочи, NHGUC (LGUC), увеличение  $\times 1000$ .  
**A** – окраска по Романовскому – Гимзе; **B** – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen  
**Fig. 2.** Cytological preparation of urine cell sediment, NHGUC (LGUC), magnification  $\times 1000$ .  
**A** – Romanovsky – Giemsa staining; **B** – silver nitrate staining, Fastgreen background staining

с перекрестной цитологической картиной с доброкачественными клетками уротелия, ретроспективно были изучены цитологические препараты пациентов, гистологическое заключение которых соответствовало уротелиальной карциноме Low grade.



**A**

**B**

**Рис. 3.** Цитологический препарат клеточного осадка мочи, HGUC, увеличение  $\times 1000$ . **A** – окраска по Романовскому – Гимзе; **B** – окраска нитратом серебра, окраска фона Fastgreen  
**Fig. 3.** Cytological preparation of urine cell sediment, HGUC, magnification  $\times 1000$ . **A** – Romanovsky – Giemsa staining; **B** – silver nitrate staining, Fastgreen background staining



При этом в клетках уротелия, окрашенных по Романовскому – Гимзе, выраженные морфологические признаки атипии отсутствовали (ЯЦС  $\leq 0,5$ , контур ядерной мембраны четкий, равномерное распределение хроматина, хроматин более грубый, чем при NHGUC). Однако при оценке ЯО оказалось, что их количество возросло в ядре клетки по сравнению с категорией NHGUC, появился и полиморфизм ЯО (рис. 2А, В).

Цитологическое заключение о наличии HGUC подтверждалось при окраске по Романовскому – Гимзе морфологическими признаками злокачественности опухолевых клеток (гиперхромией ядра, неровным контуром ядерной мембраны, грубой структурой хроматина и высоким ЯЦС –  $\geq 0,7$ ), а при окраске нитратом серебра четко визуализировались многочисленные полиморфные ЯО, сливающиеся между собой (рис. 3А, В).

На следующем этапе был проведен морфометрический анализ уротелиальных клеток с использованием программы Motic Images Advanced 3.2. Данная программа обеспечила автоматический расчет параметров, необходимых для уточняющей диагностики степени дифференцировки уротелиальной карциномы на дооперационном этапе (см. таблицу). Следует отметить, что в столбце таблицы «Заключение» представлено гистологическое послеоперационное заключение, что является «золотым стандартом» морфологической диагностики. В колонках с морфометрическими показателями (площадь ЯО, % соотношения площади ЯО к площади ядра и количество ЯО в ядре) представлены результаты автоматизированного цитоморфометрического анализа уротелиальных клеток в цитологических препаратах, соответствующих гистологической верификации.

Как видно из таблицы, параметры ЯО изменяются при увеличении степени злокачественности опухоли. Рост степени злокачественности был статистически значимо взаимосвязан с площадью ЯО ( $r_s=0,442$ ,  $p<0,0001$ ), с % соотношения площади ЯО к площади ядра ( $r_s=0,598$ ,  $p<0,0001$ ) и с количеством ЯО ( $r_s=0,769$ ,  $p<0,0001$ ). Наибольшая площадь ЯО была установлена для уротелиальной карциномы High grade, которая в 2,4 раза превышала аналогичный показатель при реактивных изменениях ( $p<0,0001$ ) и в 1,7 раза – при уротелиальной карциноме Low grade ( $p<0,0001$ ).

**Морфометрические параметры уротелиальных клеток по результатам гистологического и автоматизированного цитоморфометрического анализа**  
**Morphometric parameters of urothelial cells according to the results of histological and automated cytormorphometric analysis**

Заключение	Площадь ядрышкового организатора	% соотношения площади ядрышкового организатора к площади ядра	Количество ядрышкового организатора
Реактивные изменения (1)	524,0 [372,0–864,0]	5,7 [4,0–6,9]	4,0 [2,0–7,0]
Уротелиальная карцинома Low grade (2)	715,0 [373,0–1144,0]	7,45 [4,9–10,6]	6,0 [4,0–8,5]
Уротелиальная карцинома High grade (3)	1247,0 [907,0–2113,0]	14,8 [10,2–20,3]	11,0 [6,0–21,0]
p	$P_{1,2}=0,173$ $P_{1,3}<0,0001$ $P_{2,3}<0,0001$	$P_{1,2}=0,0003$ $P_{1,3}<0,0001$ $P_{2,3}<0,0001$	$P_{1,2}<0,0001$ $P_{1,3}<0,0001$ $P_{2,3}<0,0001$

Показатель % соотношения площади ЯО к площади ядра также имел максимальные значения при уротелиальной карциноме High grade и превышал аналогичный показатель при реактивных изменениях в 2,6 раза ( $p < 0,0001$ ), а при уротелиальной карциноме Low grade – в 2 раза ( $p < 0,0001$ ).

Количество ЯО на ядро клетки было максимальным при уротелиальной карциноме High grade и превышало аналогичные значения при уротелиальной карциноме Low grade в 1,83 раза ( $p < 0,0001$ ), а при реактивных изменениях в 2,75 раза ( $p < 0,0001$ ). При этом при уротелиальной карциноме Low grade количество ЯО на ядро клетки было в 1,5 раза выше в сравнении с реактивными изменениями ( $p < 0,0001$ ). С высокой долей вероятности этот критерий можно использовать в дифференциальной диагностике между реактивными изменениями и уротелиальной карциномой Low grade.

## ■ ВЫВОДЫ

1. Для повышения точности цитологического метода исследования в дифференциальной диагностике патологических изменений мочевого пузыря на дооперационном этапе необходимо оценивать ядрышковые организаторы (ЯО), окрашивая цитологические препараты осадка мочи нитратом серебра.
2. Возрастание значений морфометрических параметров ЯО (площадь ЯО, % соотношения площади ЯО к площади ядра, количество ЯО) отражает увеличение пролиферативной активности клеток при их злокачественной трансформации.
3. Окраска нитратом серебра цитологических препаратов осадка мочи позволяет дифференцировать карциному LGUC, которая включена в категорию NHGUC Парижской классификации 2.0, при этом следует использовать критерий количества ЯО в ядре клетки, а также морфологические особенности ЯО.
4. Для повышения точности цитологического исследования гипоцеллюлярных цитологических препаратов в диагностике HGUC в дополнение к оценке морфологических признаков злокачественности уротелиальных клеток необходимо использовать количественные и качественные критерии ЯО, которые позволят избежать гиподиагностики в цитологических заключениях врача клинической лабораторной диагностики (цитолога).
5. Окраска ЯО нитратом серебра является простым в исполнении, не требующим больших материальных затрат методом и может быть использована как альтернатива сложному и дорогостоящему иммуноцитохимическому методу исследования при оценке пролиферативной активности клеток.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Freddie B., Mathieu L., Hyuna S. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2024;74(3):229–363. doi: 10.3322/caac.21834
2. Okeanov A. et al. *Cancer in Belarus: figures and facts. Analysis of data from the Belarusian Cancer Registry for 2011–2020*. Minsk. Professional Editions, 2022;302 p. (in Russian)
3. *Algorithms of diagnosis and treatment of malignant diseases. Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus of July 06, 2018*. 60:539 p. (in Russian)
4. Fei Chen, Xiaoqi Lin. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: An Updated Review. *Journal of Clinical and Translational Pathology*. 2023;3(2):59–74. doi: 10.14218/JCTP.2022.00035
5. Barkan G.A., Wojcik E.M., Nayar R. The Paris System for Reporting Urinary Cytology: The Quest to Develop a Standardized Terminology. *Advances in Anatomic Pathology*. 2016;23(4):193–201. doi: 10.1097/PAP.0000000000000118



6. Zhang M.L., Guo A.X., Vanden Bussche C.J. Morphologists overestimate the nuclear-to-cytoplasmic ratio. *Cancer Cytopathol.* 2016;124:669–77. doi: 10.1002/cncy.21735
7. Olawunmi S. Folarin, Momin T. Siddiqui. Are we on track for diagnosing high-grade urothelial carcinoma with a minimum quantity of five malignant cells in lower tract specimens? Critical analysis of The Paris System Quantitation Criteria. *Cancer Cytopathol.* 2023;131:708–715. doi: 10.1002/cncy.22749
8. Tian W., et al. Significant reduction of indeterminate (atypical) diagnosis after implementation of The Paris System for Reporting Urinary Cytology: A single-institution study of more than 27,000 cases. *Cancer Cytopathol.* 2021;129:114. doi: 10.1002/cncy.22349
9. Il'ina T., Kazachkov E., Sergijko S. Predictive assessment of micro RNA expression level and number of nucleolar organizer regions with follicular thyroid tumor of -undetermined malignant potential. *Ural Medical Journal.* 2023;22(2):75–83. doi: 10.52420/2071-5943-2023-22-2-74-83
10. Korzhevsky D., Gilyarov A. *Fundamentals of histological technique.* Saint Petersburg: SpetsLit, 2010. 95 p. (in Russian)
11. Hubbell H.R. *Stain Technol.* 1985;60(5):285–94. doi: 10.3109/10520298509113926



Шпилюк М.А.<sup>1</sup>✉, Белова К.В.<sup>2</sup>, Кречетова Л.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

## Применение двух тестов с разными методологическими принципами выявления волчаночного антикоагулянта значительно повышает эффективность прогнозирования тромботических осложнений в клинической практике

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования, обработка, написание текста – Шпилюк М.А.; написание текста, сбор материала – Белова К.В.; редактирование, написание текста, обработка – Кречетова Л.В.

Подана: 24.06.2024

Принята: 08.10.2024

Контакты: [tambovtsevavr@mail.ru](mailto:tambovtsevavr@mail.ru)

### Резюме

**Введение.** Согласно сведениям, представленным в программе межлабораторных сличительных испытаний (МСИ «ФСВОК») по категории «волчаночный антикоагулянт», только 50% лабораторий получают результаты, основанные на использовании 2 отличающихся характером исследования тестов (методик).

**Цель.** Установить эффективность применения 2 разных методов выявления волчаночного антикоагулянта для прогнозирования тромбоза при патологии беременности.

**Материалы и методы.** В ретроспективное исследование было включено 660 пациенток. Волчаночный антикоагулянт определяли 2 независимыми методиками (dRVVT и SCT), включающими скрининговую и подтверждающую пробы на автоматическом коагулометре ACL TOP 700. Метод основан на конкурентном связывании волчаночного антикоагулянта с фосфолипидами реакционной смеси.

**Результаты.** Показано, что у пациенток в группе с положительным результатом хотя бы по одной методике риск возникновения тромботического события увеличивался в 4–5 раз (для SCT: ОШ=4,600, 95% ДИ 1,700–12,400; для dRVVT: ОШ=5,100, 95% ДИ 2,400–12,400), а при использовании 2 методов исследования одновременно (SCT и dRVVT) – более чем в 11 раз (ОШ=11,500, 95% ДИ 3,600–36,700). При расчете отношения шансов для антител к фосфолипидам только группа с положительным результатом IgG к кардиолипину показала статистически значимое увеличение тромботического риска практически в 7 раз (ОШ=6,710, 95% ДИ 1,283–35,086). При анализе положительных результатов антител к фосфолипидам (кардиолипин и  $\beta$ 2-ГП-I) по отношению к различным комбинациям методик на волчаночный антикоагулянт (положительный результат только по SCT; положительный результат только по dRVVT; положительный результат и по SCT, и по dRVVT) было обнаружено, что только антитела класса IgG как к кардиолипину, так и к  $\beta$ 2-ГП-I определяются при любой комбинации



методик на волчаночный антикоагулянт, но наиболее сильная связь ( $p < 0,0001$ ) была установлена при одновременном определении волчаночного антикоагулянта по 2 методам, различающимся характером исследования.

**Заключение.** Применение 2 методик, различающихся как ориентацией, так и принципом исследования, приводит к повышению значимости получаемой с их использованием диагностической информации и может быть полезным для стратификации пациенток по тромботическому риску.

**Ключевые слова:** волчаночный антикоагулянт, время свертывания с разбавленным ядом гадюки Рассела, время свертывания с кварцевым активатором, антифосфолипидный синдром, тромбоз, беременность

Shpilyuk M.<sup>1</sup>✉, Belova Ch.<sup>2</sup>, Krechetova L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

## Using of Two Tests with Different Methodological Principles for Lupus Anticoagulant Detection Increases Significantly the Efficiency of Predicting Thrombotic Complications in Clinical Practice

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study concept and design, processing, text writing – Shpilyuk M.; text writing, material collecting – Belova Ch.; editing, text writing, processing – Krechetova L.

Submitted: 24.06.2024

Accepted: 08.10.2024

Contacts: tambovtsevamr@mail.ru

### Abstract

**Introduction.** According to the information presented in the program of interlaboratory comparison tests (MSI "FSVOK") under the category "lupus anticoagulant" (LA), only 50% of laboratories obtain results based on the use of two tests (methods) differing by the nature of investigation.

**Purpose.** To establish the effectiveness of using two different methods of LA identifying for predicting thrombosis in pregnancy pathologies.

**Materials and methods.** The retrospective study included 660 female patients. Lupus anticoagulant (LA) was detected by two independent techniques (dRVVT and SCT), including screening and confirmatory tests using an automatic coagulometer ACL TOP 700. The method is based on competitive binding of LA to phospholipids of the reaction mixture.

**Results.** Patients of the group with positive results obtained using at least one technique were shown to have 4–5-fold increased risk of thrombotic event (for SCT: OR=4.600, 95% CI 1.700–12.400; for dRVVT: OR=5.100, 95% CI 2.400–12.400), and more than 11-fold increased risk of thrombotic event (OR=11.500, 95% CI 3.600–36.700) when two

techniques (SCT and dRVVT) were used simultaneously. When calculating the OR for aPL (antiphospholipid antibodies), only the anticardiolipin (aCL) IgG positive group showed a statistically significant increase in thrombotic risk by almost 7 times (OR=6.710, 95% CI 1.283–35.086). When analyzing the correlation between positive results of aPL (aCL and  $\beta$ 2-GP-I) with regard to different combinations of AL detection techniques (positive by SCT only; positive by dRVVT only; positive by both SCT and dRVVT), it was found that only IgG antibodies against both cardiolipin and  $\beta$ 2-GP-I were detected with any combination of LA techniques, but the strongest association ( $p < 0.0001$ ) was established when LA was detected using simultaneously 2 techniques differing by the nature.

**Conclusion.** The use of two techniques, differing both in orientation and principle of investigation, leads to an increase in the significance of diagnostic information obtained, and may be helpful in stratifying patients in terms of thrombotic risk.

**Keywords:** Lupus anticoagulant, Dilute Russell viper venom time, Silica clotting time, Antiphospholipid syndrome, Thrombosis, Pregnancy

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Волчаночный антикоагулянт (ВА) входит в гетерогенную группу антител, направленных против фосфолипидов и фосфолипидсвязывающих белков (антифосфолипидных антител, аФЛ), и является одним из 3 показателей, включенных наряду с антителами к кардиолипину (КЛ) и к  $\beta$ -2-гликопротеину-I ( $\beta$ 2-ГП-I) в лабораторные критерии диагностики антифосфолипидного синдрома (АФС) – аутоиммунного заболевания, клинически определяемого сосудистым тромбозом вне беременности и/или осложнениями при беременности [1].

Волчаночный антикоагулянт вовсе не антикоагулянт: известно, что *in vitro* составляющий его комплекс аФЛ увеличивает время свертывания и что *in vivo* его присутствие ассоциируется с развитием тромбозов. Последнее обусловлено особенностями механизмов действия ВА *in vivo*, которые определяются его взаимодействием с эндотелием и тромбоцитами. В связи с этим название «антикоагулянт» имеет условное значение, отражающее лабораторный феномен, а не патофизиологическую сущность этого вида антител. То же самое относится и ко второй половине термина – «волчаночный», которая имеет исторические корни. Ее происхождение связано с тем, что впервые приобретенные ингибиторы коагуляции были обнаружены у пациентов с системной красной волчанкой, хотя, как было показано впоследствии, чаще всего данные ингибиторы выявляются у пациенток, не имеющих этого заболевания [1–5].

Обнаружение ВА следует проводить на основании рекомендаций Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза (ISTH), которые были обновлены в 2020 г. Согласно рекомендациям, во-первых, из-за гетерогенной природы ВА для повышения чувствительности теста предлагается использование 2 методик, основанных на разных принципах аналитического исследования; при этом в первую очередь следует оценивать время свертывания крови с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT), а во вторую – чувствительное к ВА активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), причем предпочтительно исследовать время свертывания с кварцевым активатором (SCT) [4]. Стандартная же процедура



детекции ВА должна включать скрининговые, подтверждающие тесты и тест смешивания, а результаты постановки тестов следует интерпретировать как положительные или отрицательные на основании расчета нормализованного отношения скринингового и подтверждающего тестов [6].

Однако даже с учетом действующих рекомендаций диагностика ВА представляет собой с методической точки зрения сложную задачу. Так, выполненные к настоящему времени исследования показывают, что во многих случаях имеет место несоблюдение рекомендаций ISTH, что затрудняет интерпретацию данных диагностических тестов, полученных в разных лабораториях [7, 8].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам программы межлабораторных сличительных испытаний (МСИ «ФСВОК») в категории «волчаночный антикоагулянт» было выявлено, что только 50% лабораторий представляют результаты с помощью 2 методик. Это побудило нас провести работу, целью которой стало определение диагностической значимости применения 2 методик с различными принципами выявления ВА для прогнозирования возникновения тромбоза в акушерской и гинекологической практике.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование было включено 980 женщин, у которых с января 2021 г. по май 2023 г. определялся ВА. Возраст пациенток – с сосудисто-тромботическими осложнениями в анамнезе, с подозрением на аутоиммунные заболевания, в том числе на системную красную волчанку, с изолированным удлинением АЧТВ в стандартной коагулограмме, – исследованных как при подготовке к беременности, так и в I триместре, составил 18–45 лет. Критериями исключения явились: отсутствие клинической информации в электронной медицинской карте, наличие информации по использованию антикоагулянтов (антагонистов витамина К, пероральных антикоагулянтов и нефракционированного гепарина). Пациентки на фоне приема низкомолекулярных гепаринов были включены в исследование при условии взятия крови до очередной инъекции, что было отражено в карте. Исследование было проведено на базе Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова.

Оказалось, что всего 660 пациенток (средний возраст которых составил  $32,7 \pm 4,6$  года) соответствовали критериям включения и исключения и имели клинические данные в электронной медицинской карте. Наиболее часто у пациенток, вошедших в исследование, регистрировались такие осложнения, как невынашивание беременности до 10-й недели – у 301 пациентки (45,6%), потеря беременности после 10-й недели – у 39 (5,9%), тяжелая преэклампсия в анамнезе – у 27 (4,1%), антенатальная гибель плода – у 18 (2,7%), наличие личного тромботического анамнеза – у 35 (5%), а семейного – у 86 (13%) пациенток. К тому же тест на ВА был выполнен при наличии изолированного удлинения АЧТВ в стандартной коагулограмме у 19 (2,9%) пациенток.

Были сформированы 2 группы исследования:

- группа сравнения – 573 (87%) человека, в которую вошли пациентки с отрицательным результатом тестов на ВА;

- основная группа – 87 (13%) человек, в которую вошли пациентки с положительным результатом хотя бы по одной из 2 методик.

Из 660 пациенток у 492 были сделаны все 3 лабораторных теста – критерия АФС: оценка наличия в крови ВА, антител к КЛ и к  $\beta$ 2-ГП-I.

Аналитическими образцами для определения ВА служили аликвоты бестромбоцитарной плазмы, полученные двойным центрифугированием в течение 15 мин при 1600 g, после которого плазму отбирали в новую пробирку и центрифугировали 5 мин при 10 000 g.

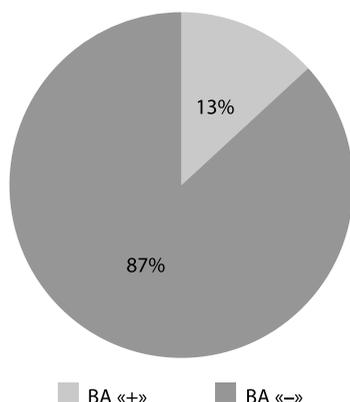
Согласно рекомендациям ISTH, ВА определяли 2 независимыми методиками (dRVVT и SCT), реализующими скрининговые и подтверждающие тесты, на автоматическом коагулометре ACL TOP 700 (IL Werfen, США), используя реагенты HemosIL. Метод основан на конкурентном связывании ВА с фосфолипидами реакционной смеси. В скрининговых тестах используются SCT- или dRVVT-реагенты с низким уровнем фосфолипидов для выявления различий между нормальной и патологической плазмами, обусловленных присутствием ВА, в подтверждающих тестах – SCT- или dRVVT-реагенты с избытком фосфолипидов для компенсации их дефицита, возникающего из-за присутствия ВА. В работе применялся интегральный алгоритм определения ВА, который подразумевает одновременную постановку как скринингового, так и подтверждающего тестов. Результаты теста выражались нормализованным отношением (normal ratio, NR), равным  $\text{Screen}_{\text{ratio}} / \text{Confirm}_{\text{ratio}}$ . Тест на ВА считали положительным при  $\text{NR} > 1,2$  для любой из методик (dRVVT и SCT).

Содержание аФЛ в сыворотке (плазме) крови определяли методом непрямой твердофазной ИФА с использованием наборов для количественного определения антител классов IgM, IgG к кардиолипину и  $\beta$ 2-гликопротеину-1 (ORGENTEC Diagnostika GmbH, Германия).

Статистический анализ полученных результатов производился с использованием программного обеспечения Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 21. Для описания количественных признаков применяли стандартные показатели описательной статистики (среднее арифметическое значение, стандартное отклонение (среднее  $\pm$  SD)). Сравнение 2 независимых переменных, распределенных по нормальному закону, проводили с помощью параметрического t-теста Стьюдента. В случае отклонения распределения переменных от нормального 2 группы независимых переменных сравнивались тестом Манна – Уитни. Критерий  $\chi^2$  использовался для сравнения различий в частоте тромботических событий и акушерских осложнений в группах лиц, исследованных на предмет наличия ВА либо методикой dRVVT, либо методикой SCT. Анализ логистической регрессии был проведен для оценки отношений шансов (ОШ) при измерении относительного риска тромботического события и гестационных осложнений для 95% доверительных интервалов (ДИ). Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из 980 пациенток, прошедших тестирование на ВА с 1 января 2021 г. по 1 мая 2023 г. и включенных в ретроспективное исследование, только 660 отвечали критериям включения/исключения и имели клинические данные в электронной медицинской карте. Положительный результат тестирования на ВА хотя бы по одной методике (рис. 1) имели 87 пациенток (13%), среди которых 45 (52%) были положительными



**Рис. 1. Доля положительных результатов тестов на волчаночный антикоагулянт от всех заказанных тестов, выполненных в период с 1 января 2021 г. по 1 мая 2023 г.**  
**Fig. 1. Percentage of positive lupus anticoagulant from all ordered tests performed between January 1, 2021 and May 1, 2023**

только по dRVVT, 24 (27%) – только по SCT, а 18 (21%) были положительными по обоим методикам (рис. 2).

В зависимости от результата теста на ВА (положительный или отрицательный) была проанализирована частота гестационных и тромботических осложнений у обследованных пациенток и выявлено значимое превышение доли положительных результатов на ВА у пациенток с тромботическими осложнениями в анамнезе (табл. 1).

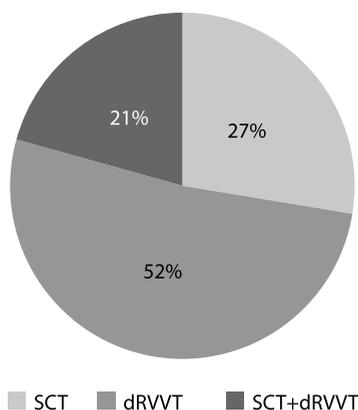
В табл. 2 представлена структура сопутствующей патологии у пациенток с разными результатами теста на ВА. Показано, что доля положительных результатов на ВА была больше у пациенток с подозрением на системную красную волчанку, а также при удлинении АЧТВ в рутинном анализе коагулограммы (табл. 2).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что изолированное удлинение АЧТВ без проявлений кровоточивости позволяет заподозрить наличие ВА. Анализ собственных данных показал, что в группе с положительным результатом

**Таблица 1**  
**Структура гестационных и тромботических осложнений у пациенток в зависимости от результата теста (положительный или отрицательный)**

**Table 1**  
**Structure of gestational and thrombotic complications in patients depending on the test result (positive or negative)**

Осложнение беременности	ВА «-», n (%)	ВА «+», n (%)	P-значение
Невынашивание беременности до 10 недель	261 (46%)	40 (46%)	0,921
Невынашивание беременности после 10 недель	35 (6%)	4 (5%)	<b>0,011</b>
Аntenатальная гибель плода	16 (3%)	2 (2%)	<b>0,008</b>
Тяжелая преэклампсия	22 (4%)	5 (6%)	<b>0,011</b>
Тромботический анамнез	25 (4%)	10 (11%)	<b>&lt;0,001</b>
Семейный тромботический анамнез	77 (13%)	9 (10%)	0,077

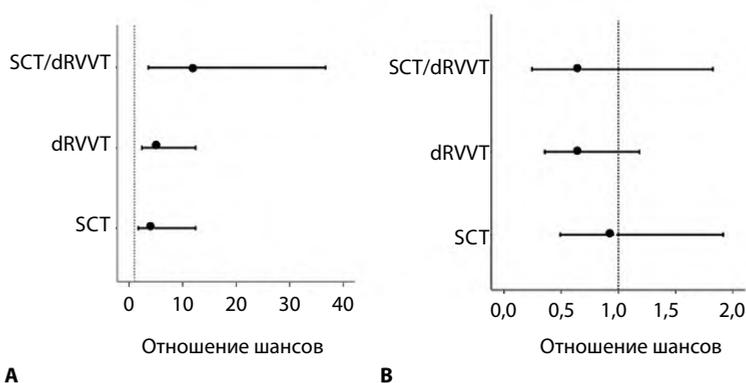


**Рис. 2. Доля положительных результатов тестов на волчаночный антикоагулянт в зависимости от теста**

**Fig. 2. Lupus anticoagulant positivity rate by test**

на наличие ВА АЧТВ статистически было больше, чем в группе с отрицательным результатом ( $38,4 \pm 17,7$  сек. против  $29,6 \pm 3,8$  сек.,  $p > 0,0001$ ).

Была проанализирована взаимосвязь результатов теста на ВА, полученных разными методами исследования, с тромботическими событиями согласно клиническим критериям АФС (один или более клинический эпизод артериального, венозного тромбоза или тромбоза мелких сосудов в любой ткани или органе). Показано, что у пациенток в группе с положительным результатом хотя бы по одной методике риск возникновения тромботического события увеличивался в 4–5 раз (для SCT: ОШ=4,600, 95% ДИ 1,700–12,400; для dRVVT: ОШ=5,100, 95% ДИ 2,400–12,400), а при использовании 2 методик одновременно (SCT и dRVVT) – более чем в 11 раз (ОШ=11,500, 95% ДИ 3,600–36,700) (рис. 3А).



**Рис. 3. Отношение шансов возникновения клинического события по критериям АФС (А – тромботический анамнез; В – патология беременности) с различными комбинациями тестов на ВА**

**Fig. 3. Odds ratio for clinical event occurrence according to APS criteria (A – thrombotic history; B – pregnancy pathology) with various combinations of LA**



Таблица 2

Структура сопутствующей патологии у пациенток в зависимости от результата теста (положительный или отрицательный)

Table 2

Structure of patients' comorbidities depending on the test result (positive or negative)

Сопутствующие патологии	BA «-», n (%)	BA «+», n (%)	P-значение
Изолированное удлинение АЧТВ	14 (4%)	22 (15%)	<0,001
Системная красная волчанка	5 (1%)	8 (9%)	<0,001
COVID-19	76 (13%)	15 (17%)	0,073

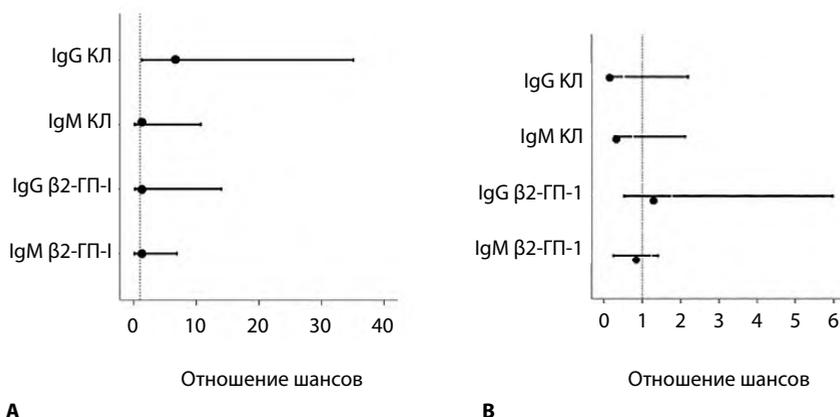


Рис. 4. Отношение шансов возникновения клинического события по критериям АФС (А – тромботический анамнез; В – патология беременности) с антителами классов G и M к beta2-ГП-I и КЛ  
 Fig. 4. Odds ratio for clinical event occurrence according to APS criteria (A – thrombotic history; B – pathology of pregnancy) with beta2-GP-I (IgG/M) and CL (IgG/M)

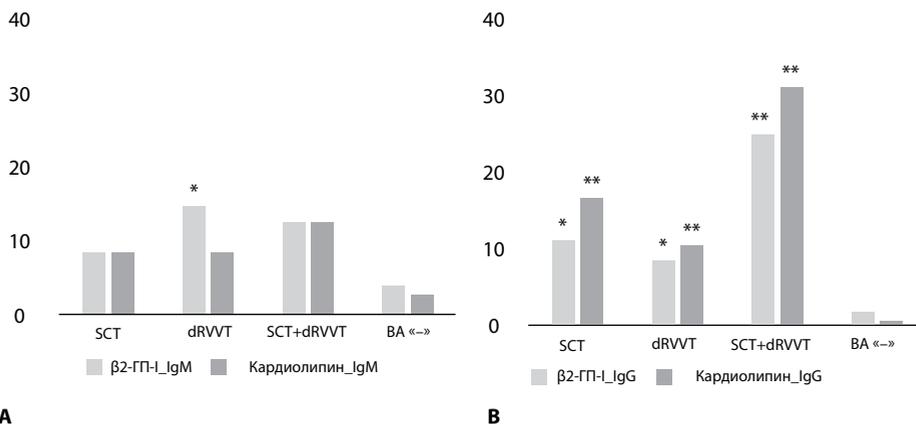


Рис. 5. Доля положительных значений аФЛ (к КЛ и к beta2-ГП-I) при различных комбинациях тестов на ВА у пациенток с итоговым положительным результатом на ВА (А – аФЛ класса M; В – аФЛ класса G), \* p<0,05, \*\* p<0,0001

Fig. 5. Percentage of positive aPL results (CL and beta2-GP-I) with various combinations of tests for LA in patients with a final positive result for LA (A – aPL IgM; B – aPL IgG), \* p<0.05, \*\*p<0.0001

Такие же расчеты были проведены для пациенток с осложнениями беременности. Данные пациентки отвечали следующим клиническим критериям АФС: 3 или более последовательных случая спонтанных абортов до 10 недель гестации, внутриутробная гибель плода, преждевременные роды до 34 недель гестации из-за выраженной преэклампсии/эклампсии или из-за выраженной плацентарной недостаточности (рис. 3Б). Однако связи наличия ВА с патологией беременности выявлено не было.

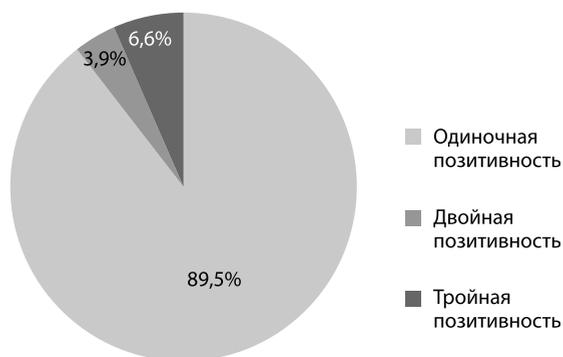
При расчете ОШ для аФЛ только группа с наличием антител класса IgG к КЛ показала статистически значимое увеличение тромботического риска практически в 7 раз (ОШ=6,710, 95% ДИ 1,283–35,086) (рис. 4А). Аналогичные расчеты были выполнены для пациенток с осложненной беременностью, однако связи с наличием аФЛ выявлено не было (рис. 4Б).

При анализе связи развития тромботических событий с наличием аФЛ (к КЛ и  $\beta$ 2-ГП-I) в случае использования различных комбинаций методов определения ВА (положительный результат только по SCT; положительный результат только по dRVVT; положительный результат и по SCT, и по dRVVT) было обнаружено, что только антитела класса IgG как к КЛ, так и к  $\beta$ 2-ГП-I определялись при любой комбинации методик на ВА ( $p < 0,05$ ), но наиболее сильная связь ( $p < 0,0001$ ) была продемонстрирована при одновременном определении ВА по 2 методикам (рис. 5).

Таким образом, развитие тромботического события чаще обнаруживалось у пациенток с положительным результатом теста на ВА как по методике dRVVT, так и по методике SCT, и у этих пациенток наблюдались высокие значения аФЛ класса IgG по сравнению с пациентками, у которых был положительный результат только по одной из используемых методик (или dRVVT, или SCT).

Для диагностики АФС в соответствии с рекомендациями ISTH должны выполняться одновременно 3 лабораторных теста (на наличие ВА, антител к КЛ и к  $\beta$ 2-ГП-I). Известно, что тройная позитивность лабораторных тестов имеет высокую корреляцию с тромбозами, нет необходимости подтверждения результата через 12 недель и в отличие от одиночной тройная позитивность возникает из-за присутствия какого-либо одного (возможно, патогенного) типа антител и не зависит от метода определения [9, 10]. В исследовании Pengo V. et al. было продемонстрировано, что пациенты с тройным положительным результатом имеют высокий риск возникновения тромботического события в течение 10 лет после обнаружения аФЛ [11]. В выполненном исследовании тройная позитивность отмечалась у 5 (6,6%) пациенток. При этом в случае оценки наличия антител к КЛ и к  $\beta$ 2-ГП-I анализировалось прежде всего наличие антител класса IgG, которые связаны в большей степени с тромбозом, чем IgM [12]. Распределение пациенток по позитивности согласно лабораторным критериям АФС представлено на рис. 6. Из 5 пациенток у 3 был подтвержденный диагноз «системная красная волчанка хронического течения, вторичный АФС», у одной пациентки – тяжелая преэклампсия, HELLP-синдром во время беременности и у одной – состояние после рецидивирующих тромбозов различной локализации.

И наконец, у 87 пациенток с положительным результатом на ВА были проанализированы результаты повторного тестирования. За повторным исследованием обратилась 21 пациентка (23%). Из них стойкий положительный результат подтвердился у 11 пациенток (51%). Стойкий положительный результат при повторном тестировании наблюдался в 85,7% случаев у пациенток, положительных как по методике dRVVT, так и по методике SCT (табл. 3).



**Рис. 6. Распределение результатов пациенток по позитивности**  
**Fig. 6. Distribution of patient results by positivity**

**Таблица 3**

**Количество положительных результатов пациенток при первичном и повторном тестировании в различных комбинациях и их процентное соотношение**

**Table 3**

**Number of positive results in patients during initial and repeated testing and their percentage**

Положительный результат	Первичное тестирование	Повторное тестирование	%
SCT+	9	3	33,3
dRVVT+	4	2	50,0
SCT/dRVVT++	7	6	85,7

Согласно полученным данным, положительный результат исследования по 2 методикам одновременно (dRVVT и SCT) означает не только увеличение риска тромбоза, но также стойкую позитивность ВА при повторном тестировании.

По рекомендациям ISTH повторное тестирование требуется после первоначального положительного результата через 12 недель и более [6]. Только у 60% пациенток нашей выборки была соблюдена данная рекомендация. Хотелось бы отметить, что в исследовании Simmons D.P. et al. [13] прослеживается аналогичная тенденция по повторному тестированию: из 1682 пациентов повторное исследование было проведено для 329 пациентов (19,5%), а повторное тестирование в сроке не менее чем через 12 недель после первого положительного результата – только для 113 пациентов (47%). Поэтому для осведомленности врачей и пациентов на бланке результатов в случае получения впервые выявленного положительного результата на ВА следует указать рекомендацию о повторном тестировании через 12 недель и более для исключения транзиторного характера наличия ВА.

Согласно руководству ISTH, ввиду отличий в характеристиках разных методик на ВА, каждая из которых обладает чувствительностью к определенным подгруппам ВА в большей или меньшей степени, рекомендуется использовать 2 методики выявления ВА с различными свойствами [6]. Тест на ВА представлен не значениями концентрации антител, он является клоттинговым тестом, стандартизация измерения кото-

рого становится достаточно сложной задачей [1]. По данным ряда авторов, ни один из используемых к настоящему времени тестов для обнаружения ВА не обладает достаточной аналитической чувствительностью в отношении всех разновидностей антител, присутствие которых обуславливает данный феномен [4, 14]. Использование 2 разных методик тестирования на ВА обеспечивает дополнительную ценность и надежность результата. Как показано в представленной работе, при тестировании только с ядом гадюки Рассела (dRVVT) теряется 1/3 положительных результатов. В работе Ahuja A. et al. [15] при оценке эффективности 4 методик на наличие ВА (время свертывания с кремниевым активатором (SCT), время свертывания с каолином, разбавленное протромбиновое время и время свертывания с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT)) было обнаружено, что чувствительность достигала 100%, если применялись 3 методики (SCT, время свертывания с каолином, dRVVT). При этом методика с dRVVT обладала наибольшей чувствительностью. Однако ISTH рекомендует только 2 теста на обнаружение ВА, поскольку увеличивается риск ложноположительных результатов, если использовать более 2 методик [6].

Пациенты с положительным результатом тестирования на ВА по обоим методикам с большей вероятностью были положительными по наличию антител к КЛ и к  $\beta 2$ -ГП-I, чем пациенты без ВА. Аналогичные результаты были получены в работе Lee Y. et al. [16]. Хотя сильных корреляций антител к КЛ или к  $\beta 2$ -ГП-I с клиническими критериями АФС в нашем исследовании не было обнаружено, наличие или отсутствие этих антител остается важным в выявлении тройных позитивных пациентов высокого риска. С учетом высокой частоты встречаемости положительного результата в ходе повторного тестирования пациенток этой группы можно полагать, что у женщин с наличием ВА, исследованных с использованием 2 независимых методик, более вероятно наличие АФС.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определение ВА является сложной задачей для клинико-диагностической лаборатории, поскольку стандартного диагностического теста для его обнаружения нет. Тем не менее выявление ВА имеет первостепенное значение, поскольку установление положительного результата в динамике при наличии в анамнезе тромботических событий является основанием для назначения длительной антикоагулянтной терапии. Разработанные за последние два десятилетия рекомендации по обнаружению ВА продолжают постоянно обновляться. Внедрение этих методических руководств во всех клинико-диагностических лабораториях и участие в программах внешнего контроля качества необходимы, чтобы помочь стандартизировать диагностические процедуры и помочь клиницистам в принятии решения о перспективах развития относительно редкого, но потенциально опасного состояния АФС.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Thachil J. Doctor, Do I Have Lupus? Time to Reconsider the Lupus Anticoagulant Terminology. *Semin Thromb Hemost.* 2021 Oct;47(7):892–894. doi: 10.1055/s-0041-1728787
2. Apipongrat D, Lamool R, Arnutti P, et al. Comparison of different algorithms for lupus anticoagulant detection: a single-center experience. *Res Pract Thromb Haemost.* 2024 Jan 30;8(1):102333. doi: 10.1016/j.rpth.2024.102333
3. Conley C.L. Disorders of the blood in disseminated lupus erythematosus. *Am J Med.* 1952 Jul;13(1):1–2. doi: 10.1016/0002-9343(52)90074-0



4. Pengo V., Tripodi A., Reber G., et al. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009 Oct;7(10):1737–40. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03555.x
5. Molhoek J.E., de Groot P.G., Urbanus R.T. The Lupus Anticoagulant Paradox. *Semin Thromb Hemost.* 2018 Jul;44(5):445–452. doi: 10.1055/s-0037-1606190
6. Devreese K.M.J., de Groot P.G., de Laat B., et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost.* 2020 Nov;18(11):2828–2839. doi: 10.1111/jth.15047
7. Cohen H., Mackie I.J., Devreese K.M.J. International Society for Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee for Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. Clinical and laboratory practice for lupus anticoagulant testing: An International Society of Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee survey. *J Thromb Haemost.* 2019 Oct;17(10):1715–1732. doi: 10.1111/jth.14560
8. Indutny A.V., Vavilova T.V., Novikov D.G., et al. Problems of laboratory based prevention of vascular accidents using various commercial lupus anticoagulant detection reagent kits. *The Siberian Scientific Medical J.* 2015;5. (in Russian)
9. Laurent C., Ricard L., Nguyen Y., et al. Triple positive profile in antiphospholipid syndrome: prognosis, relapse and management from a retrospective multicentre study. *RMD Open.* 2023 Mar;9(1):e002534. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002534
10. Pengo V. Four good reasons to appreciate triple positivity. *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(1–2):7–8. doi: 10.20452/pamw.3253
11. Pengo V., Ruffatti A., Legnani C., et al. Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study. *Blood.* 2011 Oct 27;118(17):4714–8. doi: 10.1182/blood-2011-03-340232
12. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2017 Mar;151 Suppl 1:S43–S47. doi: 10.1016/S0049-3848(17)30066-X
13. Simmons D.P., Herskovits A.Z., Battinelli E.M., et al. Lupus anticoagulant testing using two parallel methods detects additional cases and predicts persistent positivity. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Jul 26;56(8):1289–1296. doi: 10.1515/cclm-2015-0790
14. Nair S.C., Geevar T., Dave R.G. Plasma Coagulation Tests for Detection of Antiphospholipid Antibodies: What's Good, and What Might Be Improved? *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019 Jul;35(3):407–408. doi: 10.1007/s12288-019-01151-4
15. Ahuja A., Tyagi S., Pati H.P., et al. Utility of Lupus Anticoagulant Assays (APTT-LA, KCT, DPT and DRVVT) in Detection of Antiphospholipid Syndrome (APS) in High Risk Pregnancy Cases. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019 Jul;35(3):478–484. doi: 10.1007/s12288-018-01072-8
16. Lee Y., Gu J.Y., Kim H.K. Real-world evidence of lupus anticoagulant testing: simultaneous positivity of diluted Russell's viper venom time and silica clotting time increases thrombotic risk prediction. *J Thromb Thrombolysis.* 2022;54:318–322. <https://doi.org/10.1007/s11239-022-02675-9>



Черновецкий М.А.✉, Скоповец Е.Я., Агеев Н.В.  
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

## Молекулярно-генетическая диагностика инвазивных микозов у детей с онкогематологической патологией на основе этиологического анализа грибковой микрофлоры, циркулирующей в стационаре: технология и результаты исследования

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Черновецкий М.А. – методология, обобщение и анализ ретроспективных данных микробиологических исследований, библиография; Скоповец Е.Я. – проведение молекулярно-биологических исследований, разработка дизайна статьи; Агеев Н.В. – проведение молекулярно-биологических исследований, подготовка текста статьи.

Подана: 25.07.2024

Принята: 05.11.2024

Контакты: tchernovetski@mail.ru

### Резюме

**Введение.** В последние годы во всем мире возрастает актуальность грибковых инфекций. Наиболее опасными формами данного вида патологии являются инвазивные микозы с поражением внутренних органов и тканей, характеризующиеся тяжелым течением заболевания и высокой летальностью.

**Цель.** Разработка технологии мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) для диагностики инвазивных микозов в клинически значимых видах биологического материала и формирование на основе комплексного подхода с использованием молекулярно-генетического анализа картины циркуляции микромицет дрожжевой и плесневой этиологии в условиях стационара в течение последнего более чем 20-летнего периода (2002–2023 гг.).

**Материалы и методы.** В исследование были включены все штаммы грибов (микробицеты), выявленные в клинически значимом материале (кровь, моча, содержимое дыхательной системы – бронхоальвеолярный лаваж и трахеобронхиальный дренаж) у 589 детей с сопутствующими инфекциями на фоне основной онкогематологической патологии, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (далее – Центр) в период с 2002 по 2023 год включительно. Выделенные штаммы грибов были идентифицированы методами фенотипирования микромицет и оценки биохимических свойств дрожжевых патогенов с последующим подтверждением видовой идентификации отдельных штаммов грибов путем дополнительного исследования методами масс-спектрометрии белкового профиля (в варианте MALDI-TOF MS). На основе анализа этиологического спектра выделенной грибковой микрофлоры выявлены наиболее часто обнаруживаемые микромицеты с последующим подбором родоспецифичных



и видоспецифичных праймеров в рамках разработки мультиплексной реал-тайм ПЦР для диагностики инвазивных микозов.

**Результаты.** В общей сложности было выделено 620 штаммов микромицет, среди которых преобладали дрожжевые грибы: 90,05% в крови (201 из 221 гемокультуры); 87,07% в моче (101 из 116 уреакультур) и 69,61% в содержимом дыхательной системы (197 из 283 штаммов). Основными дрожжевыми патогенами явились *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida (Meyerozyma) guilliermondii*, *Candida glabrata* и *Candida krusei*. Среди плесневых микромицет основная этиологическая роль принадлежала *Aspergillus spp.* (с преобладанием *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*) и *Fusarium spp.* (с преобладанием *Fusarium solani*). На основе полученных локальных эпидемиологических данных подобраны панели праймеров и разработана технология комплексной реал-тайм ПЦР-диагностики основных возбудителей грибковых инфекций, циркулирующих в Центре.

**Заключение.** Микромицеты рода *Candida* продолжают оставаться основными возбудителями инвазивных микозов, обнаруживаемыми у детей с онкогематологической патологией. Обращает на себя внимание существенный удельный вес плесневой микрофлоры (30,39%; 86 из 283 культур) среди микромицет, выделенных из содержимого дыхательной системы. Подавляющее большинство выделенных из биологического материала микромицет (71,45%; 443 из 620 выделенных штаммов) относятся к указанным пяти видам *Candida spp.* (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida (Meyerozyma) guilliermondii*, *Candida glabrata* и *Candida krusei*) и трем видам *Aspergillus spp.* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*). Показана возможность применения реал-тайм ПЦР-детекции основных возбудителей грибковых инфекций на основе предварительного анализа микрофлоры, циркулирующей в конкретном медицинском стационаре. Внедрение современных диагностических технологий на основе использования комплексного мультиплексного ПЦР-анализа создает возможность повысить эффективность специфической диагностики грибковых инфекций.

**Ключевые слова:** инвазивные микозы, онкогематология, дети, микромицеты, мультиплексная реал-тайм ПЦР

Tchernovetski M.✉, Skapavets E., Aheyu N.  
Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

## Molecular Genetic Diagnosis of Invasive Mycoses in Children with Oncohematological Pathology Based on Etiologic Analysis of Inpatient Fungal Microflora: Study Technology and Results

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Tchernovetski M. – methodology, compilation and analysis of microbiological tests data, literature review; Skapavets E. – molecular and biological testing, article design; Aheyu N. – molecular and biological testing, text writing.

Submitted: 25.07.2024

Accepted: 05.11.2024

Contacts: tchernovetski@mail.ru

### Abstract

---

**Introduction.** Recently, fungal infections have become a growing worldwide challenge. The most dangerous forms of this pathology are invasive mycoses with involvement of internal organs and tissues, characterized by severity and high mortality.

**Purpose.** To elaborate a technology of multiplex real-time PCR (real-time PCR) for diagnosing invasive mycoses in clinically significant types of biological material and to form a pattern of yeast and mold micromycetes circulation in inpatient conditions during a more than 20-year period (2002–2023) on the basis of an integrated approach using molecular genetic analysis.

**Materials and methods.** The study covered all fungal strains (micromycetes) detected in clinically relevant material (blood, urine, and respiratory system contents) obtained from 589 children with concomitant infections against the background of underlying oncohematological pathology treated at the Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology, and Immunology from 2002 to 2023 inclusive. Isolated fungal strains were identified by micromycetes phenotyping and biochemical properties of yeast pathogens assessing with further confirmation of specific identification of individual fungal strains by extra testing using protein profile mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Based on the analysis of the etiological spectrum of the isolated fungal microflora, the most frequently detected micromycetes were identified with subsequent selection of genus-specific and species-specific primers in the framework of elaborating multiplex real-time PCR for invasive mycoses diagnosis.

**Results.** A total of 620 strains of micromycetes were isolated, among which yeasts prevailed: 90.05% in blood (201 of 221 hemocultures); 87.07% in urine (101 of 116 ureacultures); and 69.61% in respiratory contents (197 of 283 strains). The main yeast pathogens were *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida (Meyerozyma) guilliermondii*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Among mold micromycetes, the main etiological role belonged to *Aspergillus* spp. (with predominance of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*) and *Fusarium* spp. (with predominance of *Fusarium solani*). Based on the obtained local epidemiological data, primers panels were selected and the



technology of integrated real-time PCR diagnosis of the main pathogens of fungal infections circulating in the Center was elaborated.

**Conclusion.** *Candida* micromycetes remain the main causative agents of invasive mycoses in children with oncohematological pathology. A significant proportion of mold microflora (30.39%; 86 of 283 cultures) among micromycetes isolated from the respiratory contents is noteworthy. The overwhelming majority of micromycetes isolated from biological material (71.45%; 443 of 620 strains isolated) belonged to the above five species of *Candida* spp. (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida* (Meyerozyma) *guillermoidii*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*) and three species of *Aspergillus* spp. (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus niger*). The feasibility of using real-time PCR-detection of main fungal pathogens on the basis of preliminary analysis of in-patient microflora circulating in a particular hospital was demonstrated. The implementation of modern diagnostic technologies based on the use of integrated multiplex PCR-analysis provides an opportunity for improving the effectiveness of specific fungal infections diagnosis.

**Keywords:** invasive mycoses, oncohematology, children, micromycetes, multiplex real-time PCR

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Своевременное выявление возбудителей инвазивных микозов в образцах различных видов биологического материала с последующей идентификацией и определением антимикотикочувствительности является одним из основополагающих факторов успешной терапии сопутствующих грибковых инфекций у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями. Наряду с традиционно применяемыми микробиологическими методами диагностики, в последние годы успешно внедряются в практику работы медицинских учреждений гематологического и инфекционного профиля молекулярно-генетические исследования с использованием амплификационного анализа и секвенирования геномов грибковых патогенов [1–4]. Так, в частности, разработаны и используются тест-системы для детекции специфических участков геномов отдельных видов дрожжевых и плесневых микромицет с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) [5–10]. При этом, как правило, происходит изолированное обнаружение наиболее актуальных (по обобщенным данным микологических исследований) штаммов дрожжевой или мицелиальной микрофлоры. В то же время в отдельных стационарных учреждениях здравоохранения возможны различия в этиологической структуре циркулирующих грибковых патогенов – с учетом сложившейся эпидемической ситуации и вида исследуемого биологического материала.

Таким образом, разработка и применение диагностических технологий в варианте реал-тайм ПЦР, направленных на комплексное выявление и идентификацию наиболее часто обнаруживаемых в конкретном медицинском учреждении видов возбудителей инвазивных микозов, позволит не только сократить время диагностики грибковых инфекций, но и избежать расходов на проведение скрининга редко выявляемых патогенов.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка технологии мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) для диагностики инвазивных микозов в клинически значимых видах биологического материала и формирование на основе комплексного подхода с использованием молекулярно-генетического анализа картины циркуляции микромицет дрожжевой и плесневой этиологии в условиях стационара в течение последнего более чем 20-летнего периода (2002–2023 гг.).

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ этиологической структуры микромицет, выделенных из наиболее часто исследуемых клинически значимых видов биологического материала: кровь, содержимое органов дыхания (преимущественно в виде бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и трахеобронхиального дренажа (ТБД)) и моча у детей с инфекционными осложнениями на фоне основной онкогематологической патологии за период с января 2002 г. по декабрь 2023 г. Выявление и последующая идентификация возбудителя в биологическом материале, полученном из клинически значимых локусов, является одним из эффективных подходов к подтверждению клинического диагноза инвазивного микоза и служит своеобразным «золотым стандартом» диагностики. При этом наиболее широко используемыми диагностическими локусами являются система кровоснабжения, дыхательная система и система мочевыделения.

С целью выделения гемокультур производился забор венозной крови у детей с признаками сопутствующего инфекционного осложнения на фоне имеющейся онкогематологической патологии. Взятие крови проводилось трехкратно в течение дня, на фоне гипертермии, в специальные флаконы для гемокультур, предназначенные для выделения аэробной, факультативно-аэробной и грибков микрофлоры, с доставкой в лабораторию не позднее 2 часов с момента забора биологического материала. Для выделения из крови микромицет использовались двухфазные гемокультуральные флаконы фирмы Bio Rad (США), а также аналогичная продукция компаний Becton Dickinson (BACTEC PEDS PLUS/F и BACTEC Mycosis IC/F) и bioMerieux (Bact/ALERT PF Plus). Культивирование микрофлоры осуществлялось в соответствующих автоматических гемокультиваторах BACTEC 120 (Becton Dickinson, США) и Bact/ALERT 3D (bioMerieux, Франция). Длительность инкубации с целью подтверждения отсутствия роста микрофлоры составляла от 5 до 14 суток, в зависимости от используемых гемофлаконов. В случае автоматической фиксации гемокультиваторами роста микрофлоры во флаконах проводилось приготовление мазка исследуемого образца крови с его окрашиванием и микроскопией, а также последующий высев на чашки Петри с различными питательными средами.

Для выделения микромицетов из дыхательной системы использовались биологический материал, полученный при дренировании трахеобронхиального дерева (ТБД) и проведении БАЛ, а также биоптаты и аутоптаты легких, плевральная жидкость, содержимое гайморовых пазух и решетчатой кости черепа. Образцы биоматериала забирались в асептических условиях в специальные стерильные емкости с последующей незамедлительной доставкой (не позднее 2 часов) в лабораторию и посевом на чашки Петри с твердыми селективными питательными средами. Затем проводилась термоинкубация исследуемых образцов с ежесуточным визуальным контролем наличия роста грибковых культур на протяжении до 14 суток.



В свою очередь, из поступивших для проведения микробиологических исследований образцов мочи отбиралась аликвота биоматериала в объеме 10 мкл, которая вносилась в чашку Петри с питательной средой с последующим широким штриховым рассевом по поверхности питательной среды и дальнейшей инкубацией в термостате с ежедневным визуальным контролем (до 14 суток) наличия роста грибковой микрофлоры.

В качестве основных селективных питательных сред, наряду со средой Сабуро (Sabraud Dextrose Agar), применялся агар Чапека – Докса (Czapek-Dox Modified Agar), а также хромогенные среды типа сред HiCrome Candida Agar, Chromatic Candida и CHROMAgar Candida. Инкубация посевов на среде Сабуро проводилась в условиях аэробного термостатирования при температуре  $+30\pm 2$  °C; для роста грибковой микрофлоры на среде CHROMAgar Candida температура инкубирования поддерживалась в пределах  $+35\pm 2$  °C; температурный режим использования агара Чапека – Докса составлял  $+30\pm 2$  °C. Основной целью посева биологического материала на чашки Петри с селективными питательными средами являлось получение отдельных колоний так называемой чистой (изолированной) культуры потенциальных возбудителей микозов.

Параллельно с посевом проводилась микроскопия мазков нативного биоматериала, полученного из дыхательной системы и гемофлаконов с признаками роста микрофлоры. При этом рутинно использовалась стандартная окраска по Граму. В свою очередь, при идентификации изолированной грибковой микрофлоры применялись, с учетом необходимости либо целесообразности исследования, дополнительные красящие реагенты в виде Acridine Orange, Calcofluor White, Lactophenol Cotton Blue, Methenamine Silver. В зависимости от применения красителя проводилась световая, фазово-контрастная либо люминесцентная микроскопия мазков биоматериала.

Последующая родовая и в отдельных случаях видовая (при использовании хромогенных сред) идентификация выросшей на твердых питательных средах грибковой микрофлоры проводилась в первую очередь фенотипически путем оценки формы, консистенции, текстуры, характера роста и цвета колоний микромицет. Наряду с визуальной оценкой роста грибковой микрофлоры на чашках Петри с питательными средами проводилась микроскопия мазков выросших изолированных колоний микромицет. В свою очередь, для последующего определения либо подтверждения видовой принадлежности выросших культур дрожжевых грибов использовались: реагенты BBL Mycotube (Becton Dickinson, США); идентификационные планшеты Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция); диагностические планшеты API Candida Kit и API 20 C AUX (bioMerieux, Франция); панели ID 32C для полуавтоматического оборудования miniAPI (bioMerieux, Франция); идентификационные карты Vitek 2 YST для автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (bioMerieux, Франция). В качестве альтернативного подхода к идентификации дрожжевых грибов и для получения результатов объективной детекции плесневой микрофлоры использовался масс-спектрометрический анализ с применением технологии матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на масс-спектрометре Vitek MS (bioMerieux, Франция) с использованием реагентов Vitek MS FA, Vitek CHCA и Vitek MS Moulds Kit. Использовался также амплификационный анализ в варианте реал-тайм ПЦР

**Таблица 1**  
**Праймеры, используемые для верификации экстракции грибов**  
**Table 1**  
**Primers used to verify fungi extraction**

Регион	Наименование	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Источник информации
ITS1-5.8S-ITS2	ITS1F – forward	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	[11]
	ITS4 – reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

с применением как коммерческих тест-систем, так и собственной разработки в виде мультиплексной ПЦР-технологии.

Используемые на сегодняшний день коммерческие и исследовательские реал-тайм ПЦР-тест-системы нацелены в основном на выявление отдельных видов микромицет либо возбудителей одной видовой принадлежности (*Candida* spp. или *Aspergillus* spp.). Разработанная нами технология мультиплексного ПЦР-анализа позволяет проведение одновременной индикации в различных видах клинического материала наиболее актуальных циркулирующих в стационаре возбудителей инвазивных микозов различных таксономических групп (*Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucoraceae*), что позволяет повысить эффективность специфической диагностики грибковых инфекций.

Экстракция ДНК для проведения молекулярно-биологических исследований проводилась с использованием коммерческого набора NucleoSpin® Soil Genomic DNA from soil производства компании MACHEREY-NAGEL (Germany). Верификация экстракции нуклеиновых кислот патогенных микроорганизмов проводилась с использованием универсальных праймеров к ITS-региону грибов методом ПЦР с последующей визуализацией результатов амплификации с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле (табл. 1) [11].

В дальнейшем на основе референсных нуклеотидных последовательностей из базы данных GeneBank был определен дизайн видоспецифических праймеров. Пригодность видоспецифических праймеров и их специфичность изначально проверена с использованием обычной ПЦР путем детекции продуктов амплификации с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле.

В качестве контрольных образцов использовались изоляты дрожжевых и плесневых грибов, выделенные из клинически значимого материала и хранящиеся в смеси с глицерином в банке микромицет Центра при температуре –70 °С.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучена этиологическая структура выделенных грибов. При анализе приведенных в табл. 2 данных обращает на себя внимание превалирование дрожжевой микрофлоры (позиции 1–25) среди микромицет, выделенных из различных видов биологического материала: от 69,61% (197 из 283 культур) в содержимом дыхательной системы (в основном – БАЛ и ТБД) до 90,05% (201 из 221 культуры) в периферической крови. При этом отмечено существенное уменьшение удельного веса широко распространенной *Candida albicans* за счет возрастания этиологической роли так называемых non-*Candida* в виде *Candida parapsilosis*, *Candida (Meyerozyma) guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*. Одной из выявленных особенностей выделения



**Таблица 2**  
**Этиологическая структура выделенных грибов**  
**Table 2**  
**Etiological structure of isolated fungi**

№ п/п	Наименование микромицет	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2023							
		Кровь		Содержимое дыхательной системы		Моча, ≥1000 КОЕ/мл		Моча при состоянии фунгурии	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
1	<i>C. albicans</i>	30	13,57	86	30,39	25	21,55	3	13,63
2	<i>C. parapsilosis</i>	52	23,53	19	6,71	8	6,90	1	4,55
3	<i>C. (M.) guilliermondii</i>	48	21,72	10	3,53	17	14,66	5	22,73
4	<i>C. krusei</i>	16	7,24	17	6,01	8	6,90	–	0,0
5	<i>C. pelliculosa</i>	10	4,52	–	0,0	–	0,0	–	0,0
6	<i>C. glabrata</i>	8	3,62	21	7,42	27	23,28	8	36,36
7	<i>C. famata</i>	5	2,26	5	1,77	1	0,86	–	0,0
8	<i>C. tropicalis</i>	4	1,81	3	1,06	1	0,86	–	0,0
9	<i>C. lusitanae</i>	4	1,81	9	3,18	1	0,86	–	0,0
10	<i>C. haemulonii</i>	–	0,0	–	0,0	1	0,86	1	4,55
11	<i>C. magnoliae</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
12	<i>C. pseudotropicalis</i>	1	0,45	1	0,35	–	0,0	–	0,0
13	<i>C. lypolitica</i>	1	0,45	–	0,0	–	0,0	–	0,0
14	<i>C. caliculosa</i>	1	0,45	–	0,0	–	0,0	–	0,0
15	<i>C. kefur</i>	–	0,0	5	1,77	–	0,0	–	0,0
16	<i>C. norvengensis</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
17	<i>C. orthopsilosis</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
18	<i>C. inconspicua</i>	–	0,0	2	0,70	–	0,0	–	0,0
19	<i>C. auris</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
20	<i>C. spp.</i>	–	0,0	10	3,59	9	7,76	–	0,0
21	<i>Cryptococcus spp.</i>	4	1,81	–	0,0	–	0,0	–	0,0
22	<i>Trichosporon spp.</i>	6	2,72	–	0,0	2	1,72	1	4,55
23	<i>Saccharomyc. cerevis.</i>	6	2,72	6	2,12	1	0,86	–	0,0
24	<i>Rhodotorula mucilag.</i>	1	0,45	–	0,0	–	0,0	–	0,0
25	<i>Malassesizia furfur</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
26	<i>A. fumigatus</i>	–	0,0	31	10,95	–	0,0	–	0,0
27	<i>A. flavus</i>	–	0,0	14	4,95	–	0,0	–	0,0
28	<i>A. niger</i>	–	0,0	6	2,12	–	0,0	–	0,0
29	<i>A. ochraceus</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
30	<i>A. sydowii</i>	–	0,0	2	0,70	–	0,0	–	0,0
31	<i>A. nidulans</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
32	<i>A. spp.</i>	–	0,0	4	1,41	–	0,0	–	0,0
33	<i>Fusarium spp.</i>	9	4,07	–	0,0	12	10,35	3	13,63
34	<i>Mucor spp.</i>	1	0,45	6	2,12	1	0,86	–	0,0
35	<i>Rhizopus spp.</i>	1	0,45	5	1,77	–	0,0	–	0,0
36	<i>Rhizomucor pusillus</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
37	<i>Lichtheimia corymbif.</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
38	<i>Penicillium spp.</i>	–	0,0	5	1,77	2	1,72	–	0,0
39	<i>Epidermophyton spp.</i>	1	0,45	–	0,0	–	0,0	–	0,0
40	<i>Geotrichium capitat.</i>	2	0,91	–	0,0	–	0,0	–	0,0
41	<i>Trichophyton spp.</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
42	<i>Paecilomyces variotii</i>	–	0,0	2	0,70	–	0,0	–	0,0
43	<i>Purpureocillium liliac.</i>	–	0,0	1	0,35	–	0,0	–	0,0
44	<i>Scedosporium apiosp.</i>	–	0,0	2	0,70	–	0,0	–	0,0
45	Недифферен. плесень	6	2,72	3	1,06	–	0,0	–	0,0
Всего		221	100	283	100	116	100	22	100

кандид из крови является удельный вес *Candida (Meyerozyma) guilliermondii* (21,72%; 48 из 221 гемокультуры), считающейся редким возбудителем инвазивных микозов с частотой выявления в кровяном русле, не превышающей обычно несколько процентов. На фоне явного преобладания выделения дрожжевых микромицет из крови и мочи спектр грибковой флоры в содержимом дыхательной системы имеет существенные отличия за счет достаточно высокого удельного веса плесневой микрофлоры (30,39%; 86 из 283 культур), основным представителем которой являются аспергиллы, с превалированием *Aspergillus fumigatus* (52,54%; 31 из 59 изолятов аспергилл).

Несмотря на общее превалирование дрожжевой микрофлоры в структуре возбудителей инвазивных микозов у иммуносупрессивных лиц (включая детей с онкогематологической патологией) [12, 13], немаловажная роль в развитии инфекционных осложнений грибковой этиологии принадлежит представителям плесневой микрофлоры [14] и в первую очередь – микромицетам рода *Aspergillus* [15–18]. В то же время возрастает количество случаев так называемых редких сопутствующих грибковых инфекций, вызванных грибами, таксономически относящимися к *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia* spp., *Alternaria* spp. [19–23]. В отдельных случаях имеет место сочетанное инфицирование различными плесневыми патогенами [24]. К настоящему времени особое внимание (наряду с мукормикозами) привлекают грибковые инфекции, вызываемые микромицетами рода *Fusarium*. Так, по результатам выполненного исследования представители рода *Fusarium* являются основными плесневыми патогенами среди выделенных гемокультур и уреакультур у детей с онкогематологической патологией. При анализе приведенных в табл. 2 данных обращает на себя внимание превалирование представителей рода *Fusarium* среди плесневых микромицет (позиции 26–45), выделенных из периферической крови (9 из 20 штаммов гемокультур – 45,0%) и мочи (12 из 15 штаммов уреакультур – 80,0%). При этом необходимо отметить полное отсутствие фузарий в содержимом дыхательной системы. Можно предположить, что у исследованных лиц преобладало диссеминированное поражение возбудителями фузариоза мочевыделительной системы и системы кровоснабжения. С учетом наличия в Центре банка выделенных микромицет и внедрения в 2017 году в рутинную практику работы метода масс-спектрометрии в варианте MALDI TOF MS, часть детектированных микромицет удалось ретроспективно дифференцировать до вида. Так, среди представителей *Fusarium* spp. (выделенных из крови, мочи, биоптатов кожи, внутрисуставной жидкости) были выявлены *Fusarium solani* (основной патоген), *Fusarium oxysporum*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium chlamydosporum*, *Fusarium proliferatum* (табл. 3).

В свою очередь, среди представителей семейства *Mucoraceae* идентифицированы единичные штаммы *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides*. В большинстве случаев инвазивные микозы, вызываемые данной микрофлорой, носят диссеминированный характер с тяжелым клиническим течением и высоким уровнем летальности.

К сожалению, в подавляющем большинстве микробиологических лабораторий медучреждений соматического и инфекционного профиля лабораторная идентификация возбудителей филаментозных инвазивных микозов проводится лишь до уровня «плесневые грибы» без последующей родовой и/или видовой идентификации и без определения их чувствительности к применяемым антимикотикам. В результате



**Таблица 3**  
**Видовая и родовая идентификация фузарий, выделенных из клинического биоматериала**  
**Table 3**  
**Species and genus identification of *Fusarium* isolated from clinical biomaterial**

№ п/п	Наименование микромицет	Наименование биоматериала за период с 01.2002 по 12.2023							
		Кровь		Моча (≥1000 КОЕ/мл)		Биоптаты кожи		Внутриуставная жидкость	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%	К-во	%
1	<i>Fusarium solani</i>	7	77,8	3	25,0	6	100,0	1	100,0
2	<i>Fusarium oxysporum</i>	–	0,0	5	41,68	–	0,0	–	0,0
3	<i>Fusarium proliferatum</i>	–	0,0	1	8,33	–	0,0	–	0,0
4	<i>Fusarium dimerum</i>	2	22,2	1	8,33	–	0,0	–	0,0
5	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	–	0,0	1	8,33	–	0,0	–	0,0
6	<i>Fusarium</i> spp.	–	0,0	1	8,33	–	0,0	–	0,0
Итого		9	100,0	12	100,0	6	100,0	1	100,0

подобного подхода противогрибковая терапия часто проводится эмпирическим путем с высоким риском развития неблагоприятных клинических последствий, вплоть до летального исхода. В свою очередь, проведение своевременной комплексной диагностики инвазивных плесневых микозов с микробиологическим выделением возбудителей и последующей идентификацией и определением антимикотикочувствительности к противогрибковым препаратам поможет своевременно установить диагноз инфекционной патологии и назначить адекватную терапию.

Основной задачей проведенного анализа этиологической структуры выделенной грибковой микрофлоры являлись определение спектра наиболее часто выделяемых микромицет и последующая разработка мультиплексной технологии молекулярно-биологической детекции данной микрофлоры. Анализ полученной информации показал, что основными дрожжевыми патогенами во всех видах исследованного клинически значимого биоматериала являются *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida (Meyerozyma) guilliermondii*, *Candida krusei* и *Candida glabrata*. Их общий удельный вес среди общего количества микромицет составляет 69,68% (154 из 221 штамма) в крови, 54,06% (153 из 283 штаммов) в содержимом дыхательной системы и 73,28% (85 из 116 штаммов) в моче.

Таким образом, благодаря разработке мультипраймерной тест-системы, направленной на детекцию приведенных пяти дрожжевых патогенов, представляется возможным обеспечить идентификацию большинства дрожжевых микозов у детей с ОГЗ, находящихся на лечении в Центре.

В ходе проведения последующих молекулярно-биологических исследований были подобраны последовательности праймеров к участкам генома наиболее актуальных для Центра представителей дрожжевой микрофлоры и сформированы, с учетом различной частоты их выявления в клинически значимом биологическом материале, два стока праймеров (табл. 4).

С использованием подобранных комбинаций (смесей) праймеров для идентификации *Candida albicans*, *Candida krusei* и *Candida glabrata* (сток № 1), а также *Candida (Meyerozyma) guilliermondii* и *Candida parapsilosis* (сток № 2) проведена молекулярно-генетическая идентификация дрожжевой микрофлоры, выделенной из клинически

**Таблица 4**

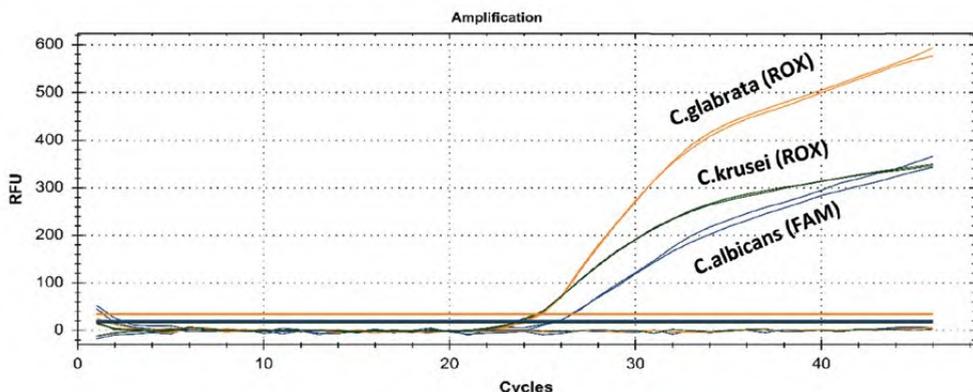
**Панель праймеров для идентификации представителей дрожжевой микрофлоры на уровне вида**  
**Table 4**

**Panel of primers for identifying representatives of yeast microflora at the species level**

Сток	№ п/п	Наименование праймера	Нуклеотидная последовательность	Метка, 5'	Метка, 3'
№ 1	1	<i>C. albicans</i> -Forward	GCTGCCTCTTCTCTGGCTAA		
	2	<i>C. albicans</i> -Reverse	GGTCGCTAGTTTCGTGTTTG		
	3	<i>C. albicans</i> -Probe	AGAGACTACCAAATGGGATGGTT	FAM	BHQ1
	4	<i>C. krusei</i> -Forward	CCTCCTTGCAATCGGGATGT		
	5	<i>C. krusei</i> -Revers	CAGTGGGTCCTCGTTCCAAA		
	6	<i>C. krusei</i> -Probe	CACTGCAGTCAAATGGAGAGGC	HEX	BHQ1
	7	<i>C. glabrata</i> -Forward	TGATTAGGCCAATTCGCTGC		
	8	<i>C. glabrata</i> -Reverse	CCGTTGGCTACTTTTATCAGCA		
	9	<i>C. glabrata</i> -Probe	TCAGCCTTAACAGAAATGAATGCAA	ROX	BHQ2
№ 2	10	<i>C.(M).guillerm.</i> -Forward	GCACCTCTGAACACCGTTA		
	11	<i>C.(M).guillerm.</i> -Reverse	GGGAACCAAGAGCCCAATCA		
	12	<i>C.(M).guillerm.</i> -Probe	GGCATGGCCCAGATGGAGGA	FAM	BHQ1
	13	<i>C. parapsilosis</i> -Forward	CATATACATGAAAATATACGTATG		
	14	<i>C. parapsilosis</i> -Reverse	CATTATCTCTATTAATCCAATAA		
	15	<i>C. parapsilosis</i> -Probe	TTCCTATGATTATATTAGTTATCTAT	HEX	BHQ1

значимого материала, полученного от детей с сопутствующими инвазивными микозами на фоне основной онкогематологической патологии.

Детекция трех дрожжевых грибов в смеси № 1 и двух других кандид в смеси № 2 показала положительные результаты (рис. 1, 2). Значение порогового цикла  $C_t$  – 25–30 циклы (смесь 1),  $C_t$  – 16–20 циклы (2-я смесь). Пороговый уровень – 10 RFU для всех каналов флуоресценции. Пригодность использования ДНК грибов из банка ДНК была дополнительно верифицирована использованием коммерческого набора АмплиСенс® *C. albicans* / *C. glabrata* / *C. krusei* МУЛЬТИПРАЙМ-FL (ФБУН «ЦНИИЭ», Россия).



**Рис. 1. Детекция дрожжевых микромицет в стоке (смеси) № 1**  
**Fig. 1. Detection of yeast micromycetes in stock (mix) № 1**

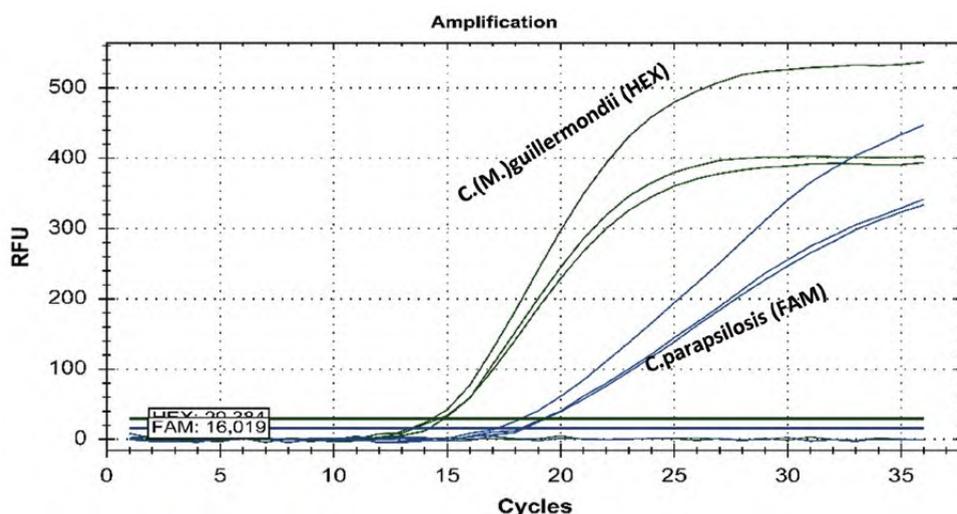


Рис. 2. Детекция дрожжевых микромицет в стоке (смеси) № 2  
Fig. 2. Detection of yeast micromycetes in stock (mix) № 2

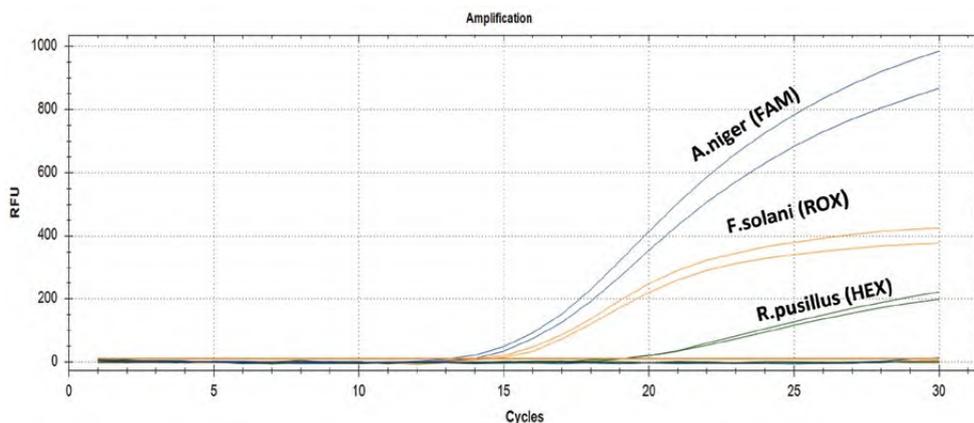
В свою очередь, проведен анализ этиологической структуры плесневой микрофлоры, выделенной из различных локусов организма. С учетом преваляирования грибов *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. и семейства Mucoraceae основной акцент сделан на разработку мультипраймерной технологии для детекции наиболее часто выявляемых представителей данных таксономических групп.

На начальных этапах была разработана панель праймеров, позволяющая идентифицировать основных представителей плесневой микрофлоры на уровне рода (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) и семейства Mucoraceae (табл. 5) [25].

Таблица 5  
Панель праймеров, используемых в мультиплексной реал-тайм ПЦР для идентификации плесневой микрофлоры на уровне рода и семейства

Table 5  
Panel of primers used in multiplex real-time PCR for identification of mold microflora on the genus and family level

№ п/п	Наименование праймеров	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Метка, 5'	Метка, 3'
1	Pan-Aspergillus-Forward	GTGGAGTGATTGTCTGCTTAATTG		
2	Pan-Aspergillus-Reverse	TCTAAGGGCATCACAGACCTGTT		
3	Pan-Aspergillus-Probe	CGGCCCTTAATAGCCCGGTCCG	FAM	BHQ1
4	Pan-Mucor-Forward	TTACRTGAGCAAATCAGARTG		
5	Pan-Mucor-Reverse	AATCYAAGAATTTACCTCTAGCG		
6	Pan-Mucor-Probe	TTAGCATGGATAACGGAATACGAC	HEX	BHQ1
7	Pan-Fusarium-Forward	TTACRTGAGCAAATCAGARTG		
8	Pan-Fusarium-Revers	AATCYAAGAATTTACCTCTAGCG		
9	Pan-Fusarium-Probe	ACGGGACGCCATAGAGGGTG	ROX	BHQ2



**Рис. 3. Идентификация плесневых микромицет**  
**Fig. 3. Identification of mold micromycetes**

Для оценки возможности родовой идентификации плесневых микромицет были выбраны штаммы *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* и *Rhizomucor pusillus*. Выбор этих штаммов для родоспецифичной мультиплексной ПЦР был обусловлен высокими значениями относительных единиц флуоресценции (RFU) в сравнении с другими представителями видов родов *Aspergillus*, *Fusarium* и семейства *Mucoraceae* (рис. 3).

В последующем был осуществлен дизайн видоспецифичных праймеров для идентификации плесневых грибов *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*. В настоящее время в качестве маркера для филогенетического анализа нитчатых аскомицетов часто используется ген  $\beta$ -тубулина (*benA*). Несмотря на более низкую чувствительность по сравнению с обычно применяемыми методами на основе амплификации ITS-региона грибов, использование данного гена оказалось высокоэффективным для детальной идентификации *Aspergillus* и находит широкое применение в молекулярно-генетической диагностике аспергиллезов [26, 27]. Проведенные исследования *in vitro* показали, что мультиплексная ПЦР на основе гена *benA* характеризуется быстротой выполнения и хорошей видовой распознаваемостью *Aspergillus* spp., а также отсутствием ложноположительных результатов по причине перекрестных реакций, которые являются недостатками молекулярной идентификации на основе ITS. Праймеры, использованные для выполнения мультиплексной реал-тайм ПЦР, представлены в табл. 6.

Амплификацию и детекцию результатов проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad) по следующему протоколу: 95 °C – 13 мин. (1 цикл); 95 °C – 15 с., 60 °C – 25 с. и 72 °C с детекцией – 15 с. (в сумме 42 цикла). В качестве положительного контроля для ПЦР-реакции использовалась ДНК *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* из собственного банка микромицет Центра, пригодность которой была проверена с помощью коммерческого ПЦР-набора для идентификации аспергилл MicoMDX *Aspergillus* (Dynamiker Biotechnology, Китай). В целях подтверждения достоверности и воспроизводимости полученных результатов ПЦР-детекция для всех исследованных образцов аспергилл проводилась «в повторях». Для исключения неспецифического



**Таблица 6**

**Панель праймеров, используемых в мультиплексной реал-тайм ПЦР для идентификации грибов рода *Aspergillus* на уровне вида**

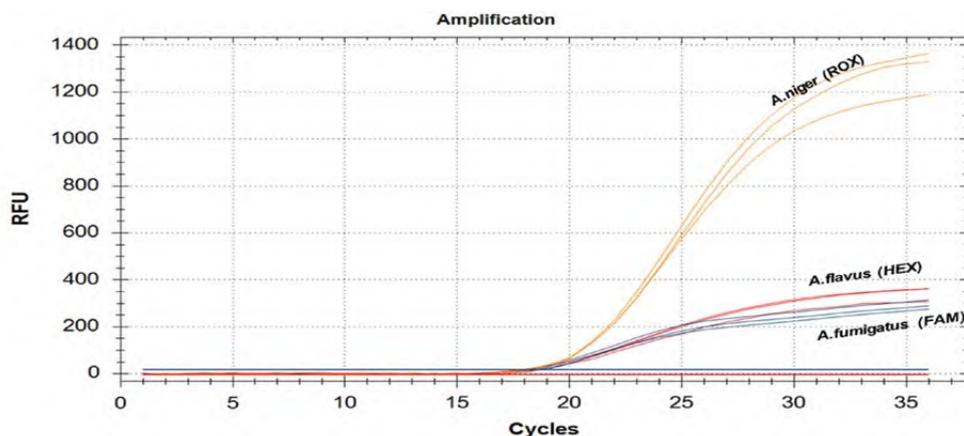
**Table 6**

**Panel of primers used in multiplex real-time PCR for identification of *Aspergillus* spp. fungi at the species level**

№ п/п	Наименование праймеров	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'	Метка, 5'	Метка, 3'
1	A. flavus-Forward	CGAGTGTAGGGTTCCTAGCGA		
2	A. flavus-Reverse	CCGGCGGCCATGAAT		
3	A. flavus-Probe	TCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCT	HEX	BHQ1
4	A. niger-Forward	GCCGGAGACCCCAACAC		
5	A. niger-Reverse	TGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATT		
6	A. niger-Probe	AATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAG	ROX	BHQ2
7	A. fumigatus-tub-Forward	TTACACGGAAGGCGCCG		
8	A. fumigatus-tub-Revers	GGATGGCAGGACCGAGAAT		
9	A. fumigatus-tub-Probe	ATTCTCTGGGCGGCGGAAC	FAM	BHQ1

взаимодействия подобранных праймеров к ДНК грибов рода *Aspergillus* с участками генома других плесневых микромицет были дополнительно проведены реакции ПЦР-анализа с микромицетами родов *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*. Неспецифической амплификации не обнаружено.

Разработанная технология качественной видовой мультиплексной реал-тайм ПЦР для детекции *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* показала высокую эффективность амплификации до  $C_q < 30$  цикла, тем самым подтверждая возможность практического применения данной инновационной технологии для идентификации наиболее актуальных, клинически значимых аспергилл в биологическом материале, полученном от детей с онкогематологической патологией (рис. 4).



**Рис. 4. Видовая ПЦР-идентификация грибов рода *Aspergillus***

**Fig. 4. Species PCR identification of *Aspergillus* fungi**

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопутствующие инфекционные осложнения, вызываемые различными видами дрожжевой и плесневой микрофлоры, продолжают оставаться одной из проблем в лечении детей с основной онкогематологической патологией. Показано, что имеет место вытеснение наиболее изученной и распространенной *Candida albicans* другими видами дрожжевых микромицет, отличающихся, как правило, большей агрессивностью в плане развития клинических проявлений инвазивных микозов и устойчивостью к применению противогрибковых препаратов. Среди плесневой микрофлоры, выделенной из клинически значимого биологического материала, преобладают представители родов *Aspergillus* и *Fusarium*. Подавляющее большинство выделенных из биологического материала микромицет (71,45%; 443 из 620 выделенных штаммов) относятся к пяти видам *Candida* spp. (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida* (*Meyerozyma*) *guilliermondii*, *Candida glabrata* и *Candida krusei*) и трем видам *Aspergillus* spp. (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus niger*). С учетом необходимости своевременной диагностики инвазивных микозов и назначения адекватной противогрибковой терапии особую актуальность в последние годы приобретает использование молекулярно-биологических исследований, в том числе ПЦР-анализа в режиме реального времени. С учетом установления этиологической структуры циркулирующей в Центре грибковой микрофлоры осуществлены исследования по разработке адекватной мультипраймерной молекулярно-биологической технологии индикации и идентификации микромицет у детей с сопутствующими инфекциями на фоне основной онкогематологической патологии. В качестве диагностической мишени отобраны представители различных родов и видов грибов, наиболее часто выделяемых из клинически значимого материала и являющихся основной этиологической причиной инвазивных микозов у детей с онкогематологической патологией, находившихся на лечении в Центре.

Внедрение и использование современных диагностических технологий в виде комплексной мультипраймерной ПЦР-диагностики позволит повысить эффективность специфической диагностики грибковых инфекций. Принимая во внимание родовое и видовое разнообразие выявляемых в биологическом материале микромицет, лабораторную диагностику инвазивных микозов целесообразно проводить с учетом этиологической структуры грибковой микрофлоры, циркулирующей в конкретном медицинском учреждении. Это позволит обеспечить экономию средств, затрачиваемых на идентификацию редко встречаемых возбудителей инвазивных микозов.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Patterson T.F. and Donnelly J.P. New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies. *Journal of Fungi*. 2019;5(1):9. Available at: <https://doi.org/10.3390/jof5010009>
2. Gudisa R., Harchand R. and Rudramurthy S.M. Nucleic-Acid-Based Molecular Fungal Diagnostics: A Way to a Better Future. *Diagnostics*. 2024;14(5):520. Available at: <https://doi.org/10.3390/diagnostics140505020>
3. Deng W., Jiang Y., Qin J. et al. Metagenomic Next-Generation Sequencing Assists in the Diagnosis of Mediastinal *Aspergillus fumigatus* in an Immunocompetent Patient: A Case report and Literature Review. *Infection and Drug Resistance*. 2023;16:1865–1874.
4. Qi G., Hao L., Gan Y. et al. Identification of closely related species in *Aspergillus* through Analysis of Whole-Genome. *Frontiers in Microbiology*. 2024;16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1323572>
5. White P.L., Alanio A., Brown L. et al. An overview of using fungal DNA for the diagnosis of invasive mycoses. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2022;22(2). Available at: <https://doi.org/10.1080/14737159.2022.2037423>



6. Fang W, Wu J, Cheng M. et al. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments. *Journal of Biomedical Science*. 2023;30, article 42. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00926-2>
7. Feifei C, Yabao C, Yin C. et al. Diagnosis of invasive pulmonary fungal infections by real-time panfungal PCR assay in non-neutropenic patients. *Medicine*. 2023;102(51):e363385. Available at: <https://doi.org/10.1097/MD00000000000036385>
8. Sujay S., Pushpa K. and Kumar G.P. Utility of Panfungal PCR in the diagnosis of invasive fungal infections in febrile neutropenia. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2021;10(7):2533–2540. Available at: [https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc\\_2325-20](https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_2325-20)
9. Springer J., Walther G., Rickerts V. et al. Detection of Fusarium Species in Clinical Specimens by Probe-Based Real-Time PCR. *Journal of Fungi*. 2019;5(4):105. Available at: <https://doi.org/10.3390/jof5040105>
10. Bergallo M., Tullio V., Roana J. et al. A Rapid and Specific Real-Time PCR Assay for the Detection of Clinically Relevant Mucorales Species. *International Journal of Molecular Science*. 2022;23(23):15066. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms232315066>
11. Amend A., Seifert K., Samson R. and Bruns T. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010;107(31):13748–13753. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000454107>
12. Etzioni T.R.G., Fainshtein N., Nitzan-Liquees A. et al. Invasive Fungal Infections in Children with Acute Leukemia: Epidemiology, Risk Factors, and Outcome. *Microorganisms*. 2024;12(1):145. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010145>
13. Bouopda Tamo S.P. Candida Infections: Clinical Features Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. 2020;2:91–102. Available at: <https://doi.org/10.36519/ldcm/2020.0006>
14. Callie-Migel L., Garido-Colino C., Santiago-Garsia B. et al. Changes in the epidemiology of invasive fungal disease in a Pediatric Hematology and Oncology Unit: the relevance of breakthrough infections. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23:348. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08314-9>
15. Oliver-Gougenheim L., Rama N., Dupont D. et al. Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Children: Novel Insight Following a National Study. *The Journal of Pediatrics*. 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2021.05.016>
16. Supatharawanich S., Narkbunnam N., Vathana N. et al. Invasive Fungal Diseases in Children with Acute Leukemia and Severe Aplastic Anemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2021;13(1):e2021039. Available at: <https://doi.org/10.4084/MJHID.2021.039>
17. Kazakou N., Vyzantiadis T.-A., Gambeta A. et al. Invasive fungal infections in a pediatric hematology-oncology department: A 16-year retrospective study. *Current Medical Mycology*. 2020;6(2):37–42. Available at: <https://doi.org/10.18502/CMM.6.2.2840>
18. Lilienfeld-Toal M., Wagener J., Einsele H. et al. Invasive Fungal infection. *Deutsches Arzteblatt International*. 2019;116:271–278. Available at: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2019.0271>
19. Biddecki G., Dona D., Geranio G. et al. Systemic Fusariosis: A Rare Complication in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Fungi*. 2020;6:212. Available at: <https://doi.org/10.3390/jof6040212>
20. Stoun N., Gupta N., Schwartz I. Mucormycosis: time to address this deadly fungal infection. *The Lancet Microbe*. 2021;2(8):e343–e344. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2666-524\(21\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S2666-524(21)00148-8)
21. Arrietta A.C., Lee A. and Tran M.T. Invasive Mold Infections in Children: Navigating Troubled Waters with a Broken Compass. *Infectious Diseases and Therapy*. 2023;12:1465–1485. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40121-023-00819-9>
22. Colosi I.A., Crisan M., Toc D.A., et al. First Reported Case of Clinically Nonresponsive-to-Itraconazole *Alternaria alternata* Isolated from a Skin Infection of Nonimmunocompromised Patient from Romania. *Journal of Fungi*. 2023;9:839. Available at: <https://doi.org/10.3390/jof9080839>
23. Gil-Pollarws P., Gracia-Cazana T., Alvarez-Salafraza M. et al. Cutaneous Alternariosis in Immunosuppressed Patients Treated with Photodynamic Therapy and oral Antifungals, a Synergistic Strategy. *Pharmaceuticals*. 2024;17(2):245. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph17020245>
24. Dunikina Y., Shagdileeva E., Khostelidi S., Shadrivova O. Combination of invasive aspergillosis and mucormycosis in children: A case report and the results of a multicenter study. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2022;24(1):14–22. Available at: <https://doi.org/10.117650/1818-8346-2017-12-4-8-17> (in Russian)
25. Walsh T.J., Wisse M.C., Grantham K.J., Petraitiene R. et al. Molecular detection and species-specific identification of medically important Aspergillus species by real-time PCR in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(12):4150–4157. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00570-11>
26. Jenks J.D., Salzer H.J.F., Hoeningl M. Improving the rates of Aspergillus detection: An update on current diagnostic strategies. *Expert Review Anti-Infectious Therapy*. 2019;17:39–50. Available at: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1558054>
27. Cruciani M., White P.L., Mengoli C. et al. The impact of anti-mould prophylaxis on Aspergillus PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76:635–638. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa948>



Yarmukhamedova N.<sup>1</sup>, Mirzaeva A.<sup>2</sup>, Akramova F.<sup>2</sup>, Shapoatov R.<sup>2</sup>, Musabaev E.<sup>3</sup>,  
Ergashova M.<sup>1</sup>, Yakubova N.<sup>1</sup>✉, Azimov D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Samarkand State Medical University, Samarkand, Uzbekistan

<sup>2</sup> Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,  
Tashkent, Uzbekistan

<sup>3</sup> Research Institute of Virology, Tashkent, Uzbekistan

## Molecular and Biological Analysis of Rickettsiosis in the Territory of Uzbekistan

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Yarmukhamedova N. – study concept, methodology, data analysis, writing; Mirzaeva A. – study concept, data analysis, visualization; Akramova F. – data analysis, writing, editing; Shapoatov R. – data analysis, writing; Musabayev E. – checking and editing; Ergashova M. – data analysis; Yakubova N. – data analysis, visualization; Azimov D. – data analysis, writing.

**Funding:** this study was conducted under a grant "Population ecology of pathogens and vectors of zoonotic diseases in the Central region of Uzbekistan" (grant No. FL – 8323102078).

The article is published in author's edition.

Submitted: 12.07.2024

Accepted: 06.11.2024

Contacts: niginayakubova1983@gmail.com

### Abstract

**Introduction.** At the current level, there is a trend of growth in natural focal tick-borne movements in the world, not excluding Uzbekistan.

**Purpose.** To conduct a molecular-genetic analysis of the prevalence of tick-borne infectious diseases in the Republic of Uzbekistan.

**Materials and methods.** Tick sampling work was carried out in 2021–2023 in the territories of Tashkent, Syrdarya, Jizzakh, Samarkand regions of our country from domestic animals belonging to the Ixodidae and Argasidae families parasitizing on livestock and wildlife, in premises where they are kept. Molecular-genetic studies were performed based on PCR analysis technologies aimed at detecting rickettsiosis.

**Results.** The extensive use of molecular-biological methods for laboratory diagnostics of rickettsioses in ticks inhabiting various regions of the Samarkand and Jizzakh provinces, along with the development of algorithms for identifying new species, formed the basis for addressing many organizational issues within the country's healthcare system. The highest rates among samples positive for rickettsiae were detected in the species *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma anatolicum*, *Rhipicephalus turanicus*, and *Rhipicephalus sanguineus* in the Jizzakh and Samarkand regions. When infection with rickettsiae was obtained by region, it was 24.1±0.6 in Samarkand region; 38.4±3.4 in Jizzakh; 0.72±0.22 in Syrdarya and 38.46±4.5 in Tashkent region. The overall infection with rickettsioses was 17.61±1.58.

**Conclusion.** The degree of infection with Rickettsiae in the studied regions was observed to be 38.4±3.4 in Jizzakh region; 24.1±0.6 in Samarkand region; 38.46±4.5 in Tashkent region; 0.72±0.22 in Syrdarya region. For the first time, 6 genotypes of *Rickettsia barbariae*, *Rickettsia massiliae* and *Rickettsia sibirica* were identified from tick samples collected in the studied area and deposited in the gene bank. Genus *Hyalomma* and *Rhipicephalus* ticks were found to be mainly important in transmitting rickettsioses.

**Keywords:** Ixodida, *R. barbariae*, *R. massiliae*, *R. sibirica*, infection



Ярмухамедова Н.А.<sup>1</sup>, Мирзаева А.У.<sup>2</sup>, Акрамова Ф.Д.<sup>2</sup>, Шапоатов Р.К.<sup>2</sup>, Мусабаев Э.И.<sup>3</sup>,  
Эргашова М.Я.<sup>1</sup>, Якубова Н.С.<sup>1</sup>✉, Азимов Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд,  
Узбекистан

<sup>2</sup> Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт вирусологии, Ташкент, Узбекистан

## Молекулярно-биологический анализ риккетсиоза на территории Узбекистана

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Ярмухамедова Н.А. – концепция исследования, методология, анализ данных, написание; Мирзаева А.У. – концепция исследования, анализ данных, визуализация; Акрамова Ф.Д. – анализ данных, написание, редактирование; Шапоатов Р.К. – анализ данных, написание; Мусабаев Э.И. – проверка и редактирование; Эргашова М.Я. – анализ данных; Якубова Н.С. – анализ данных, визуализация; Азимов Д.А. – анализ данных, написание.

**Финансирование:** данное исследование проведено в рамках гранта «Популяционная экология возбудителей и переносчиков зоонозных заболеваний в Центральном регионе Узбекистана» (грант № ФЛ – 8323102078).

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 12.07.2024

Принята: 06.11.2024

Контакты: niginayakubova1983@gmail.com

### Резюме

**Введение.** На современном этапе в мире наблюдается тенденция к росту природно-очаговых клещевых трансмиссивных инфекций, не является исключением и Узбекистан.

**Цель.** Провести молекулярно-генетический анализ распространенности клещевых трансмиссивных инфекций в Республике Узбекистан.

**Материалы и методы.** В 2021–2023 годах на территориях Ташкентской, Сырдарьинской, Джизакской, Самаркандской областей нашей страны проводились работы по сбору клещей семейств Ixodidae и Argasidae, паразитирующих на домашнем скоте и диких животных, от домашних животных, в помещениях, где они содержатся, и на открытом воздухе. Осуществлены молекулярно-генетические исследования на основе технологий ПЦР-анализа, ориентированного на выявление риккетсиоза (*Rickettsia* sp.).

**Результаты.** Широкое использование молекулярно-биологических методов лабораторной диагностики риккетсиозов у клещей, обитающих в разных районах Самаркандской и Джизакской областей, и разработка алгоритмов выявления новых их видов составили основу для решения многих организационных вопросов системы здравоохранения страны. Наибольшее количество образцов, зараженных риккетсиями, относилось к видам *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma anatolicum*, *Rhipicephalus turanicus* и *Rhipicephalus sanguineus*, собранным в Джизакской и Самаркандской областях. Зараженность риккетсиями по регионам составила: в Самаркандской области 24,1±0,6; в Джизаке – 38,4±3,4; 0,72±0,22 в Сырдарьинской и 38,46±4,5 в Ташкентской области. Общий показатель зараженности риккетсиозами был равен 17,61±1,58.

**Заключение.** Степень зараженности риккетсиями в изучаемых регионах составила 38,4±3,4 в Джизакской области; 24,1±0,6 в Самаркандской области; 38,46±4,5 в Ташкентской области; 0,72±0,22 в Сырдарьинской области. Впервые в образцах клещей,

собранных на исследуемой территории Узбекистана, идентифицировано 6 геновариантов *Rickettsia barbariae*, *Rickettsia massiliae* и *Rickettsia sibirica*. Установлено, что клещи родов *Hyalomma* и *Rhipicephalus* играют основную роль в передаче риккетсиозов.

**Ключевые слова:** *Ixodida*, *R. barbariae*, *R. massiliae*, *R. sibirica*, инфекция

---

## ■ INTRODUCTION

Blood-sucking ticks pose a serious threat to the health of farm animals and humans. Ticks act as vectors for the transmission of viruses, rickettsiae, bacteria, protozoa, causing a number of diseases. Species of ectoparasitic ticks belonging to the large family Ixodidae found in Uzbekistan, especially those parasitizing farm animals, birds and humans through ectoparasitism, pose a serious epidemiological risk [1].

These ectoparasites not only pose food safety risks but also economic problems. Global expenditures to control and reduce them and diseases transmitted by them through annual livestock losses and treatment costs are estimated at \$22–30 billion due to diseases transmitted by ticks [2]. The high diversity of species and increasing numbers of synanthropic species of pathogens carried by animals and humans in the territory of Uzbekistan indicate the possibility of the emergence of transmissible infections and invasions from natural foci to populated areas. Ticks are considered, after mosquitoes, to be the most important vectors of a large diversity of human and animal pathogens all over the world. Livestock such as cattle, sheep and goats are hosts and possible reservoirs of a variety of pathogens carried and transmitted by ticks. Arthropod-borne rickettsioses, caused by several *Rickettsia* species, are among the oldest known vector-borne diseases. Rickettsial diseases transmitted by arthropods are among the oldest known transmissible infectious diseases. After mites, ticks are the most important carriers of pathogen diversity in humans and animals worldwide [3–7].

In recent years, the use of molecular biological methods for the diagnosis of rickettsial diseases by scientists of the Omsk Scientific Research Institute of Natural Focal Infections, including the isolation of rickettsial strains (*R. conorii* subsp. *caspia*, *R. heilongjiangensis*, *R. sibirica* BJ-90, *R. slovacae*, *R. raoultii*, *R. aeschlimannii*, *R. helvetica* and *Candidatus rickettsia tarasevichiae*) from ticks and humans (TT) collected from natural foci, should be noted. The diagnosis of infections transmitted by ticks not only involves examining patients but also analyzing the tick that bit them. At the same time, it helps to identify correctly patients with unclear clinical manifestations. Polymerase chain reaction (PCR) widely used to analyze ticks for the presence of pathogenic agents, makes it possible to describe new species of rickettsiae such as *R. amblyommatis*, *R. asembonensis*, *R. asiatica*, *R. buchneri*, *R. fournieri*, *R. heilongjiangensis*, *R. gravesii*, *R. raoultii* and *R. tamur*. PCR tests are also important for detecting rickettsial pathogens in tick samples and patient biomaterials [8, 9].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To conduct a molecular-genetic analysis of the prevalence of tick-borne infectious diseases in the Republic of Uzbekistan.



## ■ MATERIALS AND METHODS

### Study design and setting

Tick sampling work was carried out in 2021–2023 in the territories of Tashkent, Syrdarya, Jizzakh, Samarkand regions of our country from domestic animals belonging to the Ixodidae and Argasidae families parasitizing on livestock and wildlife, in premises where they are kept and in open biotopes, in their nests. Tick samples (9456 n) were collected from 5234 heads of domestic animals (Table 1) using stationery and route methods (Fig. 1).

Tick collection was carried out according to the procedures described in several authors' works. Tick samples were carefully removed from the animals' bodies using forceps. They were collected in labeled glass dishes to identify species composition, study morpho-biological characteristics. Identification of tick samples in the laboratory was carried out by microscopic examination based on morphological characteristics according to determinants described in several authors' works [10–14].

### Inclusion criteria

9456 tick samples were taken for rickettsia sp examination by real-time PCR method.

### Exclusion criteria

Identification and analysis of new species of Rickettsia sp.

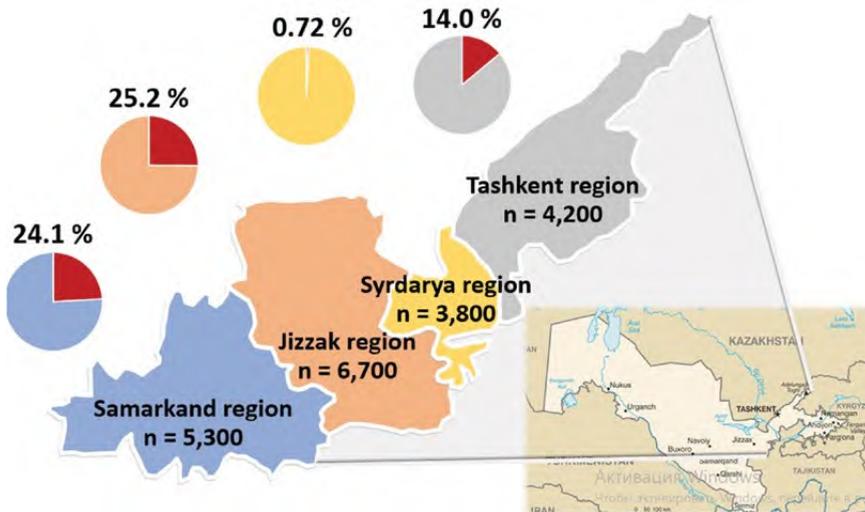


Fig. 1. Infestation of collected ticks by investigated region

Table 1  
 Primer sequences and lengths

Gene	Primer	Primer sequence (5'→3')	Length of amplicon (bp)
gltA	RS-F1	GCAAGTATTGGTGAGGATGTA	1153
	RS-R1	GTTCAGGGTCTTCGTGCA	

### Procedures

DNA extraction. 3–4 samples of each tick species and gender were placed in special tubes. Mature ticks were washed in sterile water and laterally separated with a sterile scalpel, the larger half of the ticks was crushed and the remaining part was stored at – 80 °C for further analysis. The second half of the tick was crushed in sterile tubes grouped (as described above) and washed three times in phosphate buffer before DNA extraction. DNA extraction from ticks was carried out according to the "Vector Best extraction 100" protocol. In the study, PCR amplification and sequencing were carried out to multiply and sequence samples that showed a positive result for *Rickettsia* sp. The "Vector Best" kit reagents were used to study the nucleotide sequence of the rickettsial genome gene *gltA* gene.

The following thermal cycling program was used for the amplification reaction sequence: the initial denaturation stage at 96°C for 1 minute; 2<sup>nd</sup> stage denaturation, 5 cycles: 94 °C – 15 sec, 62 °C – 20 sec, 72 °C – 20 sec; 3<sup>rd</sup> stage, 45 cycles: 94 °C – 15 sec, 60 °C – 30 sec, 72 °C – 30 sec. The chain reaction product was stored at +4 °C (Vector Best). The sequence data obtained from the study results were analyzed using the "ab1" format with the "Chromas version 1.45" program (McCarthy, 1996–1998). To correct errors in the sequence data, the sequence results read with forward and reverse primers were converted to FASTA format. To develop the phylogenetic tree of the *Rickettsia sibirica* species belonging to the *Rickettsia* genus, which was the object of the study, samples collected from the republic's territories and *gltA* (citrate synthase) gene sequences of 32 representative species belonging to this genus were used. To construct the phylogenetic tree of *Rickettsia massiliae* species, *gltA* gene sequences of 33 representative species and to construct the phylogenetic tree of *Rickettsia barbariae* species, *gltA* gene sequences of 38 representative species from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank) were used. The obtained sequences were compared using the Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW web site of the Kyoto University Bioinformatics Center (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

### Statistical analysis

The gathered information submitted into the NCB database. Statistics were analysed using the MEGA 10 program.

## ■ RESULTS AND DISCUSSION

Results obtained and their analysis: 11 species of ticks belonging to the large family Ixodidae were found on domestic animals in the study areas: *Hyalomma anatolicum*, *Hyalomma asiaticum*, *H. scupense*, *Hyalomma plumbeum*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus pumilio*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus annulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis sulcata* and one species belonging to the family Argasidae – *Argas persicus*. The degree of infection of these tick species in domestic animals such as cattle, sheep, goats, horses, donkeys and chickens was observed as follows: *Bos taurus* – 46%, *Capra hircus* 43.1%, *Ovis aries* 9%, *Equus ferus caballus* – 54.1%, *Equus asinus* – 30%, *Camelus dromedarius* – 40% and *Gallus gallus domesticus* – 61.2%. The overall infection rate of animals was found to be 53% (Table 2).



**Table 2**  
**Degree of infection of farm animals with Ixodids ticks**

Family	Type	Number of tested animal	Number of infected animals	Extensiveness of invasion (%)
Bovidae	Cattle ( <i>Bos taurus</i> )	1227	565	(46.0±0.4)
	Sheep ( <i>Ovis aries</i> )	2518	1537	(61.0±0.9)
	Goat ( <i>Capra hircus</i> )	1223	527	(43.1±1.4)
Equidae	Horse ( <i>Equus ferus caballus</i> )	61	33	(54.1±6.3)
	Donkey ( <i>Equus asinus</i> )	30	9	(30±5.4)
Camelidae	Camel ( <i>Camelus dromedarius</i> )	15	6	(40)
Galliformes	Hen ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	160	98	(61.2±4.9)
Total:		5234	2775	(53±0.6)

Here is the translation of the provided Uzbek text to English: Tick samples were tested for Rickettsiya using the PCR method. Polymerase chain reaction (PCR) is widely used to analyze ticks for the presence of pathogens that cause them. PCR tests are also important for detecting rickettsial pathogens in tick biomaterials and patient samples. During the studies, tick samples belonging to 9 species: *Argas persicus*, *R. annulatus*, *Haemaphysalis sulcata*, *Hyalomma anatolicum*, *Hyalomma asiaticum*, *H. scupense*, *R. pumilio*, *R. sanguineus*, *R. turanicus* were tested for rickettsiosis from the districts of Arnasoy, Bahmal, Dustlik, Forish, Ghallarol, Sharaf Rashidov, Mirzachel, Pakhtakor, Yangiobod, Zomin, Zarbdor of Jizzakh region. Infection with *Rickettsia* in Zomin district was observed in *Hyalomma asiaticum* 60±5.7; *Rhipicephalus turanicus* and *R. sanguineus* – 33.4±8.6. Infection was also present in other districts of the region, including *Hyalomma asiaticum* tick species 12.8±3.1 in Dustlik district; 66.7±7 in Zarbdor district with rickettsial infection observed. The presence of 53±5.4 *A. persicus* and *Hyalomma asiaticum* was identified in Sharof Rashidov. During the study in the Syrdarya region, the rate of infection with rickettsia was observed to be 20±5.7 in *Hyalomma anatolicum* in Gulistan city; 27.3±6.0% in *Rhipicephalus annulatus* in Oqoltin district; 4.2±1.1% in *Hyalomma anatolicum* in Xovas district. The degree of infection of ticks collected with *Rickettsia* spp. was 25.2% in Jizzakh region; 24.1% in Samarkand region; 14.0% in Tashkent region and 0.72% in Syrdarya region. When research was conducted in the districts of Tashkent region, infection of ticks with rickettsiae was observed in *Hyalomma anatolicum*, *H. asiaticum*, *H. scupense* species in Ohanqaron district. Chinaz – *H. anatolicum*, *H. asiaticum* and *R. sanguineus*; The presence of infection with rickettsioses in *H. asiaticum* ticks was identified in Bekobod district (Fig. 1).

Areas where ticks were collected and their degree of infection with rickettsioses. In our studies, the use of laboratory diagnostics to identify rickettsioses in ticks from different regions of Samarkand and Jizzakh regions and the development of algorithms for new species is the basis for solving urgent problems in medicine. The highest indicators among samples positive for *Rickettsia* were found in Jizzakh and Samarkand regions, where they were observed in *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma anatolicum*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus sanguineus* species. When infection with rickettsiae was obtained by region, it was 24.1±0.6 in Samarkand region; 38.4±3.4 in Jizzakh; 0.72±0.22 in Syrdarya and 38.46±4.5 in Tashkent region. The overall infection with rickettsioses was 17.61±1.58 (Table 3).

**Table 3**  
Indicator of infection of Ixodid ticks with rickettsiae

PCR analysis		Species ticks											Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
<b>Samarqand region</b>														
Tested ticks	383	432	73	184	1441	783	1538	120	346	-	-	-	-	5300
Identified rickettsiae	50	70	0	15	403	60	533	26	121	-	-	-	-	1278
%	13,1±1,7	16,2±1,8	0,0±0,0	8,2±2,0	28,0±1,4	7,7±0,9	34,7±1,2	21,7±3,8	35,0±2,6	-	-	-	-	24,1±0,6
<b>Tashkent region</b>														
Tested ticks	-	12	-	-	524	471	264	-	30	-	-	135	-	1436
Identified rickettsiae	-	14	-	-	71	72	63	-	-	-	-	20	-	220
%	-	116,7±12,7	-	-	13,5±2,2	15,3±1,7	23,9±2,6	-	0,0±0,0	-	-	14,8±3,1	-	38,46±4,5
<b>Syrdarya regions</b>														
Tested ticks	-	50	-	-	354	115	209	-	165	-	-	405	85	1383
Identified rickettsiae	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
%	-	20±5,7	-	-	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	-	0,0±0,0	-	-	0,0±0,0	0,0±0,0	0,72±0,22
<b>Jizzakh regions</b>														
Tested ticks	365	15	-	-	110	667	-	-	90	-	-	90	-	1337
Identified rickettsiae	60	-	-	-	20	235	-	-	40	-	-	70	-	425
%	16,4±1,9	0,0±0,0	-	-	18,2±3,7	35,2±1,8	-	-	44,4±5,2	-	-	77,8±4,4	-	38,4±3,4
<b>Total</b>														
Tested ticks	748	509	73	184	2429	2036	2011	120	631	-	-	630	85	9456
Identified rickettsiae	110	94	-	15	494	367	596	26	161	-	-	90	-	1953
%	14,7±1,3	18,5±1,7	0,0±0,0	8,2±2,0	7,99±0,6	18±0,8	29,6±1,02	21,7±3,7	25,5±1,7	-	-	14,3±1,4	0,0±0,0	17,61±1,58



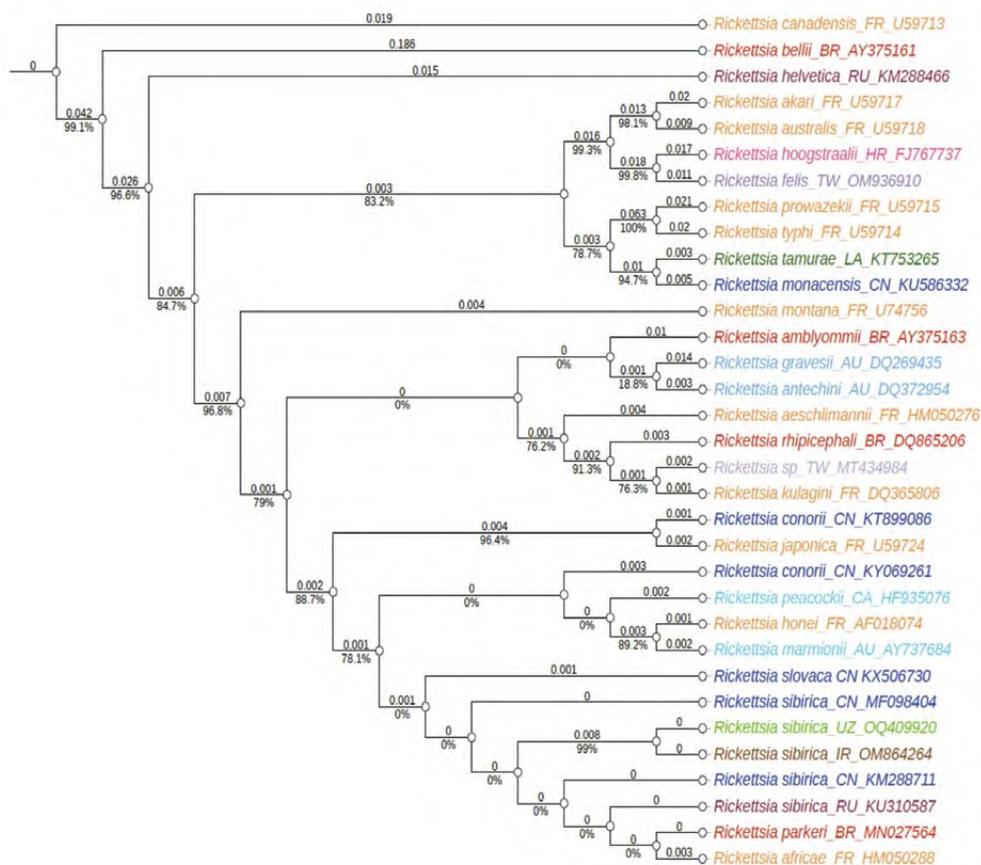
**Table 4**  
**Rickettsia species in ticks from Samarkand and Jizzakh regions**

Type of rickettsia	Type of tick	Entry number	Region
	<i>R. sanguineus</i>	OQ076762	Jizzakh
<i>R. barbariae</i>	<i>H. asiaticum</i>	OQ383213	Jizzakh
	<i>H. asiaticum</i>	OQ409916	Jizzakh
	<i>R. turanicus</i>	OQ409917	Jizzakh
	<i>H. anatolicum</i>	OQ409919	Samarkand
	<i>H. anatolicum</i>	OQ409921	Samarkand
<i>R. massiliae</i>	<i>H. scupense</i>	OQ409918	Samarkand
<i>R. sibirica</i>	<i>H. scupense</i>	OQ409920	Samarkand

The highest indicators among samples positive for *Rickettsia* were found in Jizzakh and Samarkand regions, where six genotypes of *Rickettsia barbariae* were found in *Hyalomma asiaticum*, *Hyalomma anatolicum*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus sanguineus* species. Additionally, *R. massiliae* and *R. sibirica* were identified from *H. scupense* ticks in the Samarkand region. These species had not been previously noted in Uzbekistan (Table 4).

To construct the phylogenetic tree of *Rickettsia sibirica* species, which was the object of our study belonging to the *Rickettsia* genus, *gltA*, *ompA*, *ompB*, *sca4* gene sequences of 32 representative species belonging to this genus from samples collected in the Republic and National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank) were used. The obtained sequences were compared using the Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW web service of the Kyoto University Bioinformatics Center (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). The comparison results were edited using the Geneious Prime 2023.2.1 program and based on them, the phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood using the IQ-TREE web server (<https://http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>). Command code: `path_to_iqtree -s Rickettsia_sibirica.aln -st DNA -m TEST -bb 1000 -alrt 1000`. The phylogenetic tree was visualized using the iTOL, web program (<https://itol.embl.de/login.cgi>). *Rickettsia canadensis* (NCBI ID: U59713) species was taken as an external group. According to the results obtained, the *Rickettsia sibirica* species studied was located in a single monophyletic group with a common ancestor with the *Rickettsia sibirica* species registered in the NCBI database with the entry number OM864264. The branch length was 0.008. Bootstrap loading value of 100/100 was determined [15, 16] (Fig. 2).

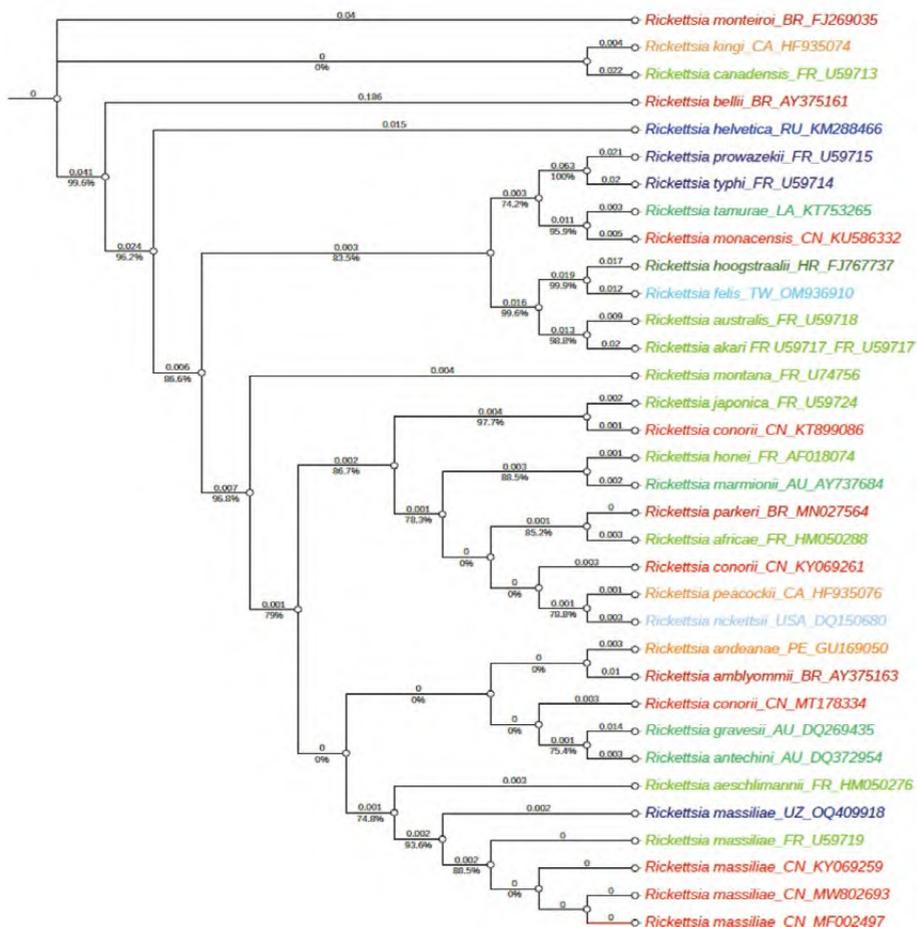
To construct the phylogenetic tree of *Rickettsia massiliae* species, *gltA* (citrate synthase) gene sequences of 33 representative species belonging to this genus from samples collected in the republic and National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank) were used. The phylogenetic tree was constructed in the manner described above. *Rickettsia monteiroi* (NCBI ID: FJ269035) species was taken as an external group. According to the results obtained, the identified *Rickettsia massiliae* was located in a single monophyletic group with a common ancestor with a number of *Rickettsia monteiroi* species registered in the NCBI database with the entry numbers U59719, KY069259, MW802693 and MF002497. Bootstrap loading value of 93.6/98 was observed (Fig. 3).



**Fig. 2.** Analysis of the *Rickettsia sibirica* gltA DNA gene region (in the direction of the last three sides from 5' to 3'). Placement of the phylogenetic tree in monophyletic groups

To construct the phylogenetic tree of *Rickettsia barbariae* species, gltA (citrate synthase) gene sequences of 38 representative species belonging to this genus from 6 samples collected in the Republic and National Center for Biotechnology Information (NCBI, GenBank) were used (Fig. 4).

Candidate *R. barbariae* was first identified in Portugal in 2006 in the tick species *Rhipicephalus bursa*. In Italy in 2008, it was identified from a species of *R. turanicus* and confirmed by the author. Subsequently, Candidatus genotypes of *R. barbariae* were detected in other countries in 2014 in *R. sanguineus* from Israel. In China, *R. heilongjiangii*, *R. sibirica*, *R. raoultii*, *R. slovacica*, *R. felis*, *R. aeschlimannii* and *R. massiliae* have been identified. In our country, Candidatus *R. barbariae* was first detected in tick species *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *H. asiaticum*, and *H. anatolicum*. *R. massiliae* was identified in 1993. In Europe, including France, Greece, Spain, Portugal and Switzerland, the authors identified in ticks. In the USA, *Rhipicephalus sanguineus* was observed in ticks. *Rhipicephalus sanguineus* has also been associated with the causative agent of Rocky

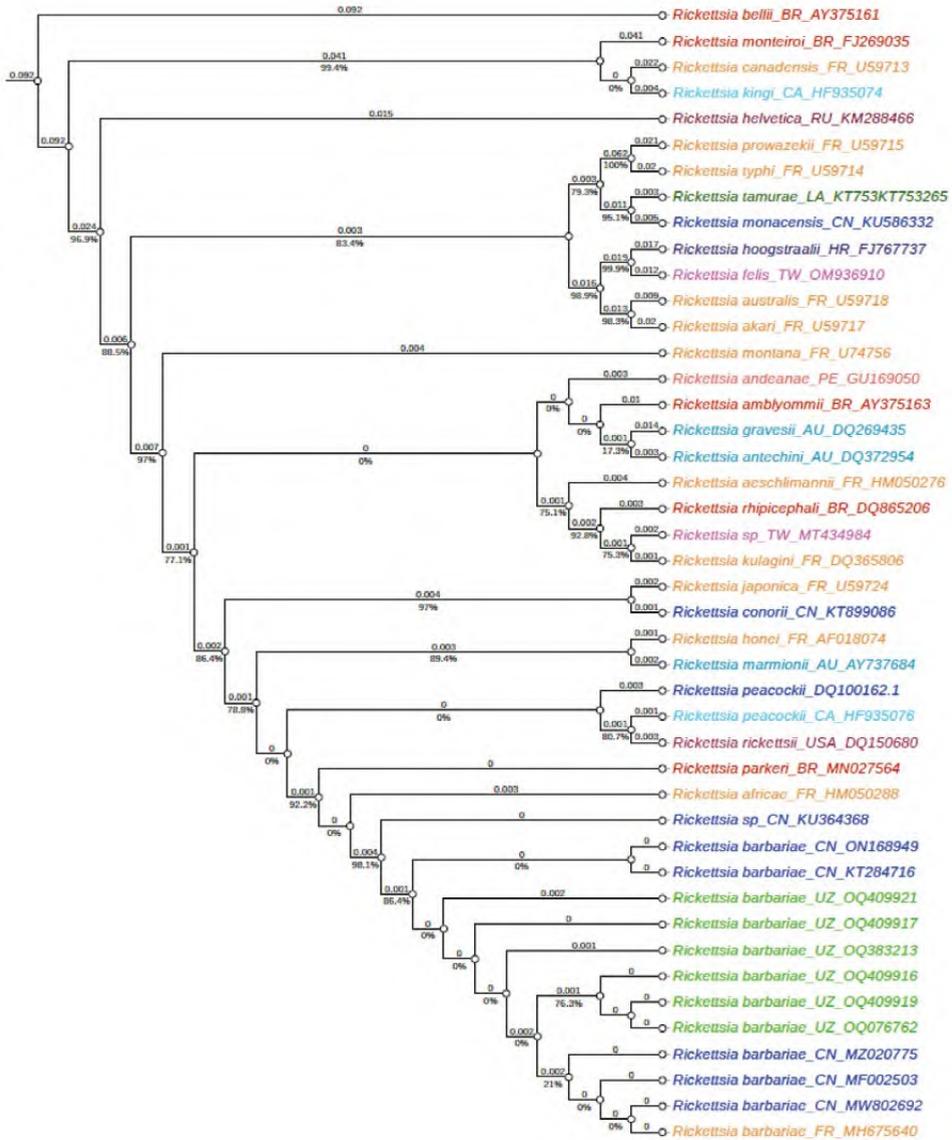


**Fig. 3. Analysis of the *Rickettsia massiliae* gltA DNA gene region (in the direction of the last three sides from 5' to 3'). Placement of the phylogenetic tree in monophyletic groups**

Mountain spotted fever, *R. rickettsii*. In our study, the occurrence of *R. massiliae* and *R. sibirica* from ticks of *H. scupense* species was noted [17–27].

## CONCLUSIONS

The degree of infection with rickettsiae in the studied regions was observed to be  $38.4 \pm 3.4$  in Jizzakh region;  $24.1 \pm 0.6$  in Samarkand region;  $38.46 \pm 4.5$  in Tashkent region;  $0.72 \pm 0.22$  in Sirdarya region. For the first time, 6 genotypes of *Rickettsia barbariae*, *Rickettsia massiliae* and *Rickettsia sibirica* were identified from tick samples collected in the studied area and deposited in the gene bank. *Hyalomma* and *Rhipicephalus* ticks were found to be mainly important in transmitting rickettsioses.



**Fig. 4. Analysis of the Rickettsia barbariae gltA DNA gene region (in the direction of the last three sides from 5' to 3'). Placement of the phylogenetic tree in monophyletic groups**

In this study, for the first time we detected *R. barbariae*, *R. sibirica* and *R. massiliae* strains from ticks collected in Eastern Uzbekistan.

The examined strains of *R. sibirica* and *R. barbariae* showed highest similarity with strains from the surrounding countries China and Iran. Whereas, *R. massiliae* clustered with a sequence from France. These findings underline the importance of surveillance to monitor the natural spread of pathogens as well as dissemination via travel.



## ■ REFERENCES

1. Yarmukhamedova N., Mirzaeva A., Akramova F., Toremuratov M. Distribution of tick-borne rickettsia in various areas of the Samarkand region. *Materials of the international scientific and practical conference "Innovative foundations of agricultural and bioecological research in the Aral Sea region"*. 2023;368–370. (in Uzbek)
2. Jongejan F., Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004;129:3–14.
3. García-Alvarez L., Palomar A.M., Oteo J.A. Prevention and prophylaxis of tick bites and tick-borne related diseases. *Am. J. Infect. Dis.* 2013;9:104–116.
4. Lew-Tabor A.E., Rodriguez Valle M. A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:573–585.
5. Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P.E., Sotto A., Labauge P., Raoult D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008;2:338.
6. Parola P., Paddock C.D., Raoult D. Tick borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:719–756.
7. Wardeh M., Risley C., McIntyre M.K., Setzcorn C., Baylis M. Database of host pathogen and related species interactions, and their global distribution. *Sci. Data.* 2015;15:2:150049.
8. Raoult D., Fournier P.E., Eremeeva M., Graves S., Kelly P.J., Oteo J.A., Sekeyova Z., Tamura A., Tarasevich I., Zhang L. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1063:1–12.
9. Rudakov N., Shpynov S., Samoilenko I., Obert A. Tick-borne rickettsiosis and rickettsia of the tick-borne spotted fever group in Russia. *Omsk Scientific Bulletin.* 2011;232. (in Russian)
10. Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J.L., Guglielmone A., Horak I., Jongejan F. et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. Appl. Acarol.* 2004;38:219–235.
11. Filippova N. Ixodid Ticks of the Subfamily Am-blyominae (Fauna of Russia and the Adjoining Countries). *Arachnida.* 1997;4:5. (in Russian)
12. Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada-Pena A., Horak I.G., Shao R., Barker S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid tick names. *Zootaxa.* 2010;2528:1–28.
13. Horak I.G., Camicas J.L., Keirans J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* 2002;28:27–54.
14. Pospelova-Shtrom M. On the method of feeding Ixodidae ticks in the laboratory. *Med. parasite. and parasite. Bol.* 1941;3–4.
15. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research.* 2021;49:1:293–296.
16. Trifinopoulos J., Nguyen L.T., Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:1:232–235. doi: 10.1093/nar/gkw256
17. Beati L., Raoult L. *Rickettsia massiliae* sp.nov., a new spotted fever group rickettsia. *Int J Syst Bacteriol.* 1993;43:839–840.
18. Beati L., Roux V., Ortuno A., Castella J., Segura Porta F., Raoult D. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group rickettsiae isolated from catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J Clin Microbiol* 1996;34:2688–2694.
19. Chochlakis D., Ioannou I., Sandalakis V., Dimitriou T., Kassinis N., et al. Spotted fever group Rickettsiae in ticks in Cyprus. *Microb Ecol.* 2012;63:2:314–23.
20. De Sousa R., Barata C., Vitorino L., Santos-Silva M., Carrapato C., Torgal J., et al. Rickettsia sibirica isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2006;12:7:1103–8.
21. Demma L.J., Traeger M.S., Nicholson W.L. et al. Rocky mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Engl J Med.* 2005;353:587–594.
22. Guo L.P., Mu L.M., Xu J., Jiang S.H., Wang A.D., et al. Rickettsia raoultii in Haemaphysalis erinacei from marbled polecats, China-Kazakhstan border. *Parasit Vectors.* 2015;8:461.
23. Mirzaeva A., Musabaev E., Yarmukhamedova N., Mirkasimova Kh., Akramova F. The significance of Ixodida ticks in the spread of infectious diseases. *Medical Biodefense Conference.* 2023. (in Uzbek)
24. Mirzaeva A., Yarmukhamedova N., Akramova F., Kamolkhodjaev D., Shapaotov R., Esonboev J. The importance of Ixodoidea ticks in the spread of infectious diseases. *Problems of biology and medicine.* 2023;3.1:145:198–201. (in Uzbek)
25. Mura A., Masala G., Tola S., Satta G., Fois F., Piras P. et al. First direct detection of rickettsial pathogens and a new rickettsia, 'Candidatus Rickettsia barbariae', in ticks from Sardinia, Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:11:1028–33.
26. Waner T., Keysary A., Eremeeva M.E., Din A.B., Mumcuoglu K.Y. et al. Rickettsia africana and Candidatus Rickettsia barbariae in ticks in Israel. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:5:920–2.
27. Wei Q.Q., Guo L.P., Wang A.D., Mu L.M., Zhang K. et al. The first detection of Rickettsia aeschlimannii and Rickettsia massiliae in Rhipicephalus turanicus ticks, in northwest China. *Parasit Vectors.* 2015;8:1:631.



Джурабекова А.Т., Насретдинова М.Т.✉, Шомуродова Д.С., Камалова М.И.  
Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд, Узбекистан

## Патоморфологические изменения ткани коры и субкортикальных отделов головного мозга у крыс при моделировании гипотиреоза нарушением кровоснабжения щитовидной железы

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Джурабекова А.Т. – концепция и дизайн исследования, обзор литературы; Насретдинова М.Т., Шомуродова Д.С. – построение и расчет данных для статистического анализа; Камалова М.И. – редактирование.

Подана: 02.05.2024

Принята: 04.11.2024

Контакты: luna1088@mail.ru

### Резюме

**Введение.** Статья посвящена патоморфологическим изменениям в коре и подкорковых структурах головного мозга при гипотиреозе, вызванном нарушением кровоснабжения щитовидной железы.

**Цель.** Изучить патоморфологические изменения в корковых слоях и подкорковых структурах головного мозга крыс при нарушении функции щитовидной железы ограничением ее кровоснабжения.

**Материалы и методы.** Исследована ткань головного мозга 16 белых беспородных крыс-самок массой  $250 \pm 50$  г на базе Самаркандского государственного медицинского университета и Республиканского патологоанатомического центра в период 2021–2023 гг. Технология операции состояла в осуществлении ряда последовательно выполняемых этапов. После обработки операционного поля производились разрез кожи и разведение краев раны на держалках. Тупым способом раздвигались мышцы и обнажалась трахея, что открывало доступ к щитовидной железе. Далее электрокоагулятором производилась коагуляция верхней и нижней щитовидной артерии справа. После прекращения кровотока через артериальные сосуды щитовидной железы обнаруживались признаки ишемии головного мозга, сама же щитовидная железа становилась синюшной (но при этом не производилась оценка секреторной активности щитовидной железы). Затем по возможности послойно восстанавливали топографию мышц и мягких тканей. Из 16 животных умерли, не выходя из наркоза, 4, примерно через 12 часов по окончании операции. Оставшиеся 12 животных легко вышли из наркоза и через 6 часов уже подходили к корму и воде. Выведение животных из опыта осуществлялось под этиминал-натриевым наркозом путем внутрибрюшинного введения наркотического средства в дозе 50 мг/кг массы тела. Сразу же после наступления смерти у животных выделяли головной мозг и сердце, ополаскивали их 2-кратно холодным 0,9%-ным (9 г/л) раствором хлорида натрия, осуществляли фиксацию органов в 10%-ном (100 г/л) нейтральном формалине с последующими проводкой в изопропанол, заливкой образцов в парафин и приготовлением срезов и стеклов. Окрашивание препаратов ткани выполняли гематоксилином-эозином.



**Результаты.** Установлено, что у животных с нарушением функции щитовидной железы возникают характерные изменения в нейронах коры больших полушарий головного мозга и подкорковых центров. По мере усугубления нарушений цитоархитектоники коры головного мозга увеличивалось количество пирамидных клеток и астроцитов, уменьшалась масса белого вещества, замещаемого миелиновыми нервными волокнами. Отмечена размытость границ пирамидных клеток коры головного мозга, которые выглядели тоньше, с резко истонченными отростками апикальных дендритов. Патоморфологические изменения мозговой ткани проявлялись также в уменьшении просвета сосудов, мукоидном набухании их стенок, неравномерной полноте, извилистости сосудов, деформации стенок сосудов с развитием ангиосклероза. Выявленные патоморфологические нарушения завершаются атрофическими и склеротическими изменениями ткани и отеком головного мозга. Нарушения структурно-функциональных свойств головного мозга могут быть расценены как ведущий этиопатогенетический фактор в развитии патоморфологических изменений в тканях головного мозга.

**Заключение.** Вызванное обтурацией артериальных сосудов щитовидной железы нарушение кровоснабжения в ней влечет за собой формирование сочетанной патологии – ишемии головного мозга на фоне нарушений функции щитовидной железы, которая проявляется дистрофическими изменениями в нейронах коры головного мозга и подкорковых центров. Выявлено, что усугубление нарушений в коре головного мозга выражается в увеличении количества пирамидальных клеток и астроцитов. Происходящие в ткани головного мозга патоморфологические и сосудистые изменения (сужение просвета сосудов, их извилистость, мукоидное набухание клеток), выявленные после обтурации артериальных сосудов, кровоснабжающих щитовидную железу, рассматриваются как главные факторы нарушения функций головного мозга, что расценивается как одно из проявлений сочетанной патологии.

**Ключевые слова:** патоморфология, корковый слой, головной мозг, щитовидная железа, мозговая ткань, хроническая ишемия мозга, гипотиреоз

Djurabekova A., Nasretdinova M.✉, Shomurodova D., Kamalova M.  
Samarkand State Medical University, Samarkand, Uzbekistan

## Pathomorphological Changes in Cortical and Subcortical Tissue of the Brain in Rats in Modeling Hypothyroidism by Thyroid Blood Supply Impairment

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Djurabekova A. – study concept and design, literature review; Nasretdinova M., Shomurodova D. – statistics plotting and calculating; Kamalova M. – editing.

Submitted: 02.05.2024

Accepted: 04.11.2024

Contacts: luna1088@mail.ru

---

### Abstract

**Introduction.** The article deals with pathomorphological changes in the cortex and subcortical structures of the brain in hypothyroidism induced by impaired blood supply of the thyroid gland.

**Purpose.** To study pathomorphological changes in the cortical layers and subcortical structures of the rat brain in thyroid dysfunction due to limited blood supply.

**Materials and methods.** The brain tissue of 16 white outbred female rats weighing  $250 \pm 50$  g was examined at the Samarkand State Medical University and the Republican Pathological Anatomical Center in the period 2021–2023.

The surgical technology consisted of a number of sequentially performed stages. After processing the surgical field, the skin was incised and the wound edges were spread on holders. The muscles were bluntly moved apart and the trachea was exposed opening access to the thyroid gland. Then, the upper and lower thyroid arteries on the right were coagulated with an electrocoagulator. After the blood flow through the arterial vessels of the thyroid gland was stopped, signs of cerebral ischemia were detected, and the thyroid gland itself became cyanotic (but the secretory activity of the thyroid gland was not assessed). Next, the topography of muscles and soft tissues was restored layer by layer, as far as possible. Of the 16 animals, 4 died without coming out of anesthesia, approximately 12 hours after the end of the operation. The remaining 12 animals easily came out of anesthesia, and after 6 hours they were already approaching food and water. The animals were withdrawn from the experiment under ethaminal sodium anesthesia by intraperitoneal administration of the narcotic agent at a dose of 50 mg/kg of body weight. Immediately after death, the brain and heart were extracted from the animals and rinsed twice with cold 0.9% (9 g/l) sodium chloride solution; the organs were fixed in 10% (100 g/l) neutral formalin, followed by immersion in isopropanol. The specimens were embedded in paraffin, and sections and slides were prepared. Tissue preparations were stained with hematoxylin and eosin.

**Results.** It was found that animals with thyroid dysfunction exhibited characteristic changes in neurons of the cerebral cortex and subcortical centers. As the cytoarchitectonic disorders of the cerebral cortex worsened, the number of pyramidal cells and astrocytes increased, and the mass of white matter, replaced by myelinated nerve fibers, decreased. Blurring of pyramidal cortex cell boundaries was observed; they looked thinner, with



sharply thinned processes of the apical dendrites. Pathomorphological changes in the brain tissue were also manifested by vessels lumen narrowing, mucoid swelling of their walls, uneven fullness, tortuosity of the vessels, and deformation of the vessel walls with subsequent angiosclerosis. The revealed pathomorphological disorders resulted in atrophic and sclerotic tissue changes and cerebral edema. Disturbances of structural and functional properties of the brain can be recognized as a leading etiopathogenetic factor of pathomorphological changes in the brain tissue.

**Conclusion.** The disruption of blood supply in the thyroid gland caused by obstruction of the arterial vessels leads to a combined pathology, i.e. cerebral ischemia, against the background of dysfunction of the thyroid gland, which is manifested by dystrophic changes in the neurons of the cerebral cortex and subcortical centers. It was revealed that the aggravation of disorders in the cerebral cortex was expressed in an increase in the number of pyramidal cells and astrocytes. Pathomorphological and vascular changes occurring in the brain tissue (vessels lumen narrowing, their tortuosity, mucoid cells swelling), revealed after obturation of arterial vessels supplying the thyroid gland, are considered the main factors of brain dysfunction, which is regarded as one of manifestations of combined pathology.

**Keywords:** pathomorphology, cortex, brain, thyroid gland, brain tissue, chronic cerebral ischemia, hypothyroidism

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Известно, что гормоны щитовидной железы имеют фундаментальное значение в развитии головного мозга и являются важными факторами, обеспечивающими его функционирование на протяжении всей жизни [1, 7]. Их действие опосредовано связыванием со специфическими мембранными и внутриклеточными рецепторами, регулирующими геномные и негеномные механизмы в нейронах и популяциях глиальных клеток [3, 5]. Разнообразные механизмы их влияния включают регуляцию процессов пластичности нейронов, стимуляцию ангиогенеза и нейрогенеза, а также модуляцию динамики элементов цитоскелета и процессов внутриклеточного транспорта [2, 4]. Эти механизмы перекликаются с теми, которые, как было установлено, способствуют восстановлению утраченных неврологических функций в течение первых недель и месяцев после ишемического инсульта [6, 8]. Стимуляция передачи сигналов гормонов щитовидной железы в постишемическом мозге может быть многообещающей терапевтической стратегией для активации эндогенных механизмов восстановления [9, 11].

К настоящему времени известны различные модели формирования гипотиреоза у крыс. В литературе рассматриваются как медикаментозные, так и хирургические способы его формирования. Так, была разработана модель гипотиреоза с применением йододефицитной диеты у крыс. Для создания экспериментальной модели с дефицитом йода в питании крыс использовались продукты местного происхождения с низким содержанием йода. В качестве основного продукта питания использовался комбикорм с добавкой премикса, не содержащего йод. Ряд авторов моделировали гипотиреоз путем применения тиреостатиков, например, путем введения через специальный зонд в желудок мерказолила в дозе 10 мг/кг в течение 8 недель [3, 9, 10].

Цвиркун Д.В. вызывала гипотиреоз у крыс мерказолилом (Акрихин, Россия), который давали животным с питьевой водой: первые 2 недели – в виде 0,02%-го раствора, затем – 0,01% [1, 5]. Щеглаковой Г.Ю. и соавт. [6] предложено моделировать гипотиреоз путем введения через пищевой зонд сечением 4 мм водно-крахмальной суспензии мерказолила 1 раз в сутки на протяжении 30 суток из расчета 25 мг/кг. Некоторые авторы для моделирования дисфункции щитовидной железы лабораторным животным в течение 2 месяцев вводили с питьевой водой 0,005%-й раствор препарата мерказолил. Некоторые исследователи вызывали гипотиреоз ежедневным внутрижелудочным введением тиамазола в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела в течение 3 недель [2]. При всех нехирургических моделях экспериментальный гипотиреоз характеризовался снижением концентрации свободного тироксина (Т4), повышением содержания общего трийодтиронина (Т3) и тиреотропного гормона (ТТГ). Обращает на себя внимание, что в литературе было описано немного хирургических моделей этого состояния [7, 11]. Тем не менее хирургическая модель является наиболее сходной с клинической ситуацией, так как она воспроизводит механизм послеоперационного гипотиреоза и нивелирует влияние тиреостатиков на организм животного, что позволяет более достоверно и информативно изучить патофизиологические последствия тиреоидэктомии. Кроме того, в описанных моделях формирования гипотиреоза последний создается путем удаления части органа или всей щитовидной железы, что может осложняться кровотечением, асфиксией, гипопаратиреозом [7].

Исходя из изложенного, представлялось целесообразным осуществить создание модели «хирургического» гипотиреоза без удаления органа – за счет коагуляции верхней и нижней щитовидной артерии справа. Авторы ряда исследований указывают на значительную связь между гормонами щитовидной железы и исходом после инсульта.

Представленный обзор сведений о влиянии гормонов щитовидной железы на «здоровый мозг» акцентирует внимание на модулируемых нарушении функции щитовидной железы молекулярных путях формирования ишемического инсульта. Они могут составлять потенциальную мишень для терапевтического вмешательства [10, 12].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить патоморфологические изменения в корковых слоях и подкорковых структурах головного мозга крыс при нарушении функции щитовидной железы ограничением ее кровоснабжения.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала исследования использовался головной мозг 16 белых беспородных самок крыс массой 230–260 г. Исследования проводились в Самаркандском государственном медицинском университете и Республиканском патологоанатомическом центре в период 2021–2023 гг.

Выведение животных из опыта осуществлялось под этаминал-натриевым наркозом путем введения производящего наркотическое действие раствора внутривентрикулярно в дозе 50 мг/кг массы тела. Сразу же после наступления смерти у умерших животных выделяли головной мозг и сердце, ополаскивали их 2-кратно холодным 0,9%-ным (9 г/л) раствором хлорида натрия, осуществляли фиксацию органов



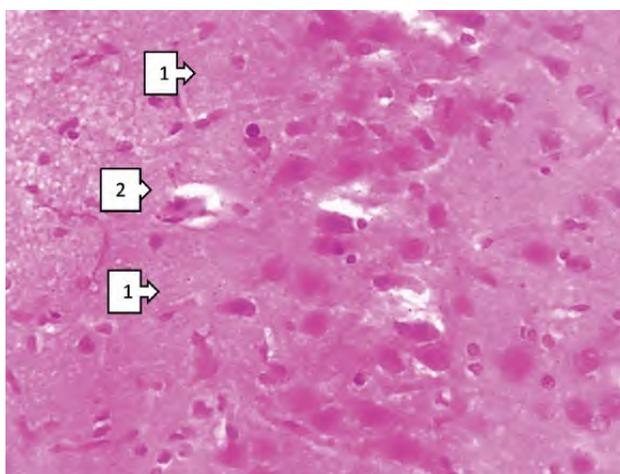
в 10%-ном (100 г/л) нейтральном формалине с последующей проводкой в изопропанол, заливкой образцов в парафин и приготовлением срезов и стекол. Окрашивание изготовленных препаратов тканей выполняли гематоксилином-эозином.

Технология операции состояла в осуществлении ряда последовательно выполняемых этапов. После обработки операционного поля производили разрез кожи и разводили края раны на держалках. Тупым способом раздвигали мышцы и обнажали трахею, открывая доступ к щитовидной железе.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выведенных из опыта животных с моделированным нарушением функционального состояния щитовидной железы подвергали аутопсии. При исследовании гистологических препаратов головного мозга выявлены патоморфологические изменения, характерные для хронической ишемии головного мозга, в том числе дистрофические изменения в нейронах, являющихся активными клетками коры больших полушарий головного мозга и подкорковых центров. По мере усугубления нарушений citoархитектоники коры головного мозга увеличивалось количество пирамидных клеток, астроцитов, а также миелиновых нервных волокон. Наблюдалась размытость границ пирамидных клеток коры головного мозга, они выглядели тоньше, с резко истонченными отростками апикальных дендритов.

На этом фоне аксоны представлялись тусклыми из-за характерных изменений цитоплазмы клеток, отмечалось скопление тел нейронов в перикарионных областях. Констатирована пролиферация макро- и микроглиальных клеток вокруг пирамидных клеток (рис. 1). В результате большая часть связей между нервными клетками резко сокращается.



**Рис. 1.** Ткань коры головного мозга. Пирамидные клетки окружены пролиферативными глиальными клетками (1). В фокусе определяются очаги с развитием перичеселлярного отека (2). Окраска Г.Э. 40×10

**Fig. 1.** Cerebral cortex. Pyramidal cells are surrounded with proliferative glial cells (1). Foci with pericellular edema are revealed in the focus (2). G.E. 40×10 staining

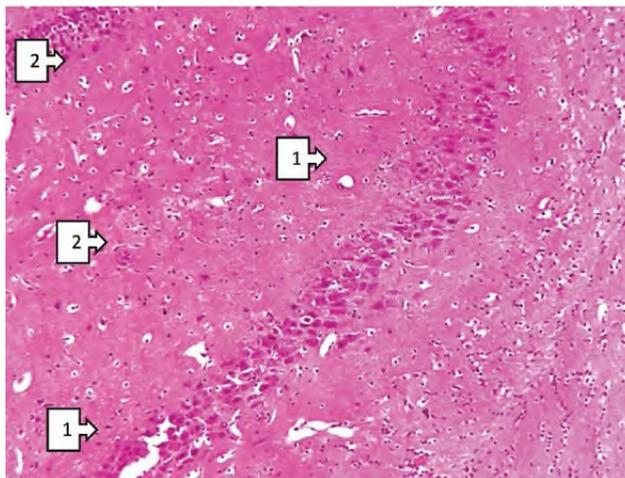
В стенке мозговых сосудов выявляются склеротические изменения на фоне развития разрежения периваскулярных волокнистых структур (в клинической ситуации аналогичные процессы могут сопровождаться снижением памяти, быстроты ответных реакций, иногда заторможенностью). Диаметр просвета сосудов головного мозга уменьшен, вокруг них определяются очаги периваскулярного склероза. В мелких капиллярах определяется феномен очагового сладжа.

В выполненном нами исследовании отмечались уменьшение размеров пирамидных клеток, локальные перичеселлюлярные отеки; при этом глиальные клетки занимали большую часть стромы головного мозга, что в клинических ситуациях приводит к тяжелой потере памяти и другим клиническим синдромам.

Поскольку ткань гиппокампа очень чувствительна к гипоксии, при хронической гипоксии ее нейроны (пирамидные клетки) сморщиваются, уменьшаются и в размерах, и в количестве. Далее следует миграция микро- и макроглиальных клеток между соседними нейрональными клетками, преимущественно за счет пролиферации глиоцитов сателлитного типа. В клинических ситуациях эти морфологические изменения зависят от длительности процесса и проявляются резким снижением памяти, поведенческих реакций и угасанием эмоционально необходимых поведений.

Отмеченные нами резкие изменения нормальной гистоархитектоники ткани гиппокампа проявляются в основном дислокацией клеточных структур и интерстициальными отеками (рис. 2).

Выявляется неравномерное наполнение сосудов головного мозга и увеличение количества глиальных клеток в периваскулярных зонах. Эти процессы приводят к торможению и разного рода нарушениям в проводящих путях головного мозга.



**Рис. 2.** Ткань гиппокампа. Выявляются расположенные в столбчатой форме интерпозиционные очаги между пирамидными клетками (1). Местами определяются очаги перичеселлюлярных отеков (2). Окраска Г.Э. 10×10

**Fig. 2.** Hippocampus. Columnar interpositional (intermediate glial cells) foci between pyramidal cells are revealed (1). Foci of pericellular edema are detected in places (2). H.E. 10×10 staining

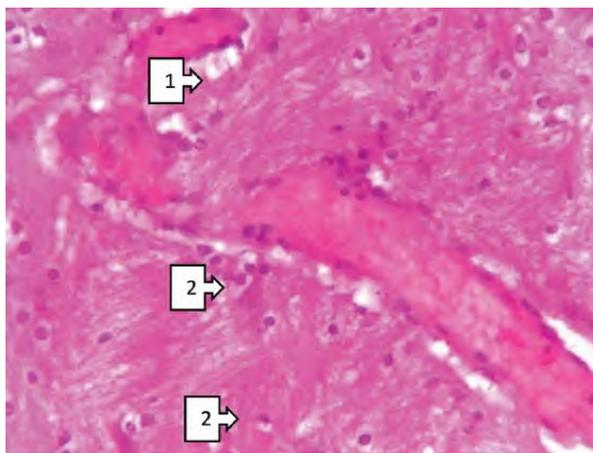


При микроскопическом исследовании гистопрепаратов, представляющих собой поперечные срезы гиппокампа, обнаруживается большое количество очагов интерпозиции (промежуточных глиальных клеток) между пирамидными клетками, расположенными столбчатой парой. Этот тип морфологических изменений поддерживается высокой чувствительностью гиппокампа к явлению гипоксии и продолжающимся снижением числа нейронов при хронической ишемии.

Различный вид ангиосклероза и периваскулярного отека определяется в стенках сосудов головного мозга и в их ветвях в области основания головного мозга. Поэтому установлено, что процесс хронической гипоксии в какой-либо области головного мозга приводит к развитию микрорубцовых процессов, перичеллюлярных отеков вокруг нейрональных клеток и пролиферативно-активных очагов глиальных клеток в этих участках (рис. 3, 4). В клинической ситуации подобные изменения сопровождаются снижением памяти и эмоционального поведения.

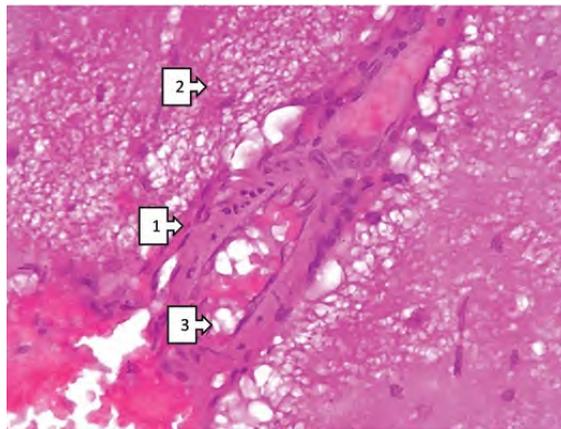
Микроскопически определяется отдаление клеток друг от друга, что объясняется увеличением относительного содержания мукоидного микседематозного вещества. Морфологические исследования выявили уменьшение количества пирамидных клеток, скопление темных базофильных включений (липофусцин) в перинуклеарных областях, увеличение гомогенных темных включений зернистого вида в цитоплазме глиоцитов. Ядро микроглиальных клеток имеет гиперхромный вид, определяется их расположение в один ряд. Для этой локализации характерно увеличение мукоидных веществ во внеклеточном матриксе и расположение глиальных клеток в один ряд.

Хроническая ишемия головного мозга в условиях гипотиреоза приводит к большому скоплению микседематозных веществ, сконцентрированных вокруг



**Рис. 3. Ткань подкорковых структур головного мозга. В подкорковом центре белого вещества головного мозга обнаружен мелкокалиберный сосуд, сосуд полнокровный, стенка деформирована, выявляется перисклероз (1), в строме белого вещества определяются интерстициальные отеки (2). Окраска Г.Э. 20×10**

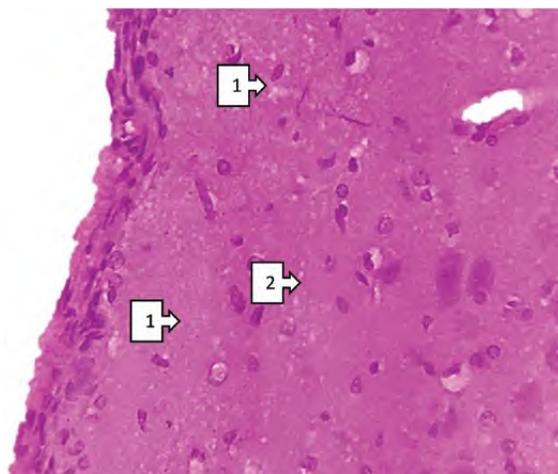
**Fig. 3. A small caliber vessel was found in the subcortical center of the cerebral white matter, the vessel is full-blooded, the wall is deformed, perisclerotic changes are detected (1); interstitial edema is detected in the stroma of the white matter (2). H.E. 20×10 staining**



**Рис. 4. Структура белого вещества головного мозга. В сосудистой стенке выявляются ангиосклероз (1), периваскулярный отек и хаотично расположенный очаг разреженной фиброзной структуры (2). Определяются пролиферация перicyтов сосудистых стенок и сужение сосудистого пространства (3). Окраска Г.Э. 40×10**

**Fig. 4. Structure of the white matter of the brain. The vascular wall shows angiosclerosis (1), perivascular edema and randomly located foci of sparse fibrous structure (2). Vascular wall pericytes proliferation and vascular space narrowing are detected (3). H.E. 40×10 staining**

проводящих путей нейронов, препятствующих прохождению импульсов, а также к скоплению патологических импульсов между аксондентритными пучками. Все эти процессы предрасполагают к возникновению эпилептических судорог. Морфологически в цитоплазме глиоцитов появляются избыточное скопление окрашенных оксифилом включений гликогена и скопление мукоидных набухших клеток вдоль линии, развиваются перицеллюлярные отеки (рис. 5).



**Рис. 5. Ткань коры головного мозга. Промежуточное вещество ткани мозга темно-розового цвета, микседематозное набухание (1), цитоплазма крупных глиальных клеток темно-базофильная, увеличена в размерах (2). Окраска Г.Э. 40×10**

**Fig. 5. Cerebral cortex, intermediate brain substance dark pink, myxedematous swelling (1), cytoplasm of large glial cells dark is basophilic and increased in size (2). H.E. 40×10 staining**



**Рис. 6. Проводящие пути в ткани белого вещества головного мозга. На фоне белого вещества головного мозга обнаруживается большое количество глиальных клеток (1). Окраска Г.Э. 4×10**  
**Fig. 6. Conductive pathways of the white matter of the brain. A large number of glial cells are detected on the background of the cerebral white matter (1). H.E. 4×10 staining**

Эти процессы, в свою очередь, приводят к оголению глиальных клеток вокруг нейронов. В результате нарушается проводимость ионов по проводящим путям, что приводит к накоплению патологических импульсов. В клинической ситуации эти изменения сопровождаются вялостью, снижением памяти, низкими эмоциональными реакциями на окружающую среду.

В ткани головного мозга на фоне нарушения функции щитовидной железы определяются микседематозное набухание стромы и образование разреженных волокнистых структур. При этом определяется уменьшение количества пирамидных клеток гипоталамуса и их атрофия. Содержание глиоцитов также уменьшено, выявлено увеличение количества клеток с цитоплазмой, богатой включениями. Большая часть дистрофических изменений возникает в пирамидных клетках с последующим очаговым скоплением глиальных клеток, некробиозом, а также репаративной регенерацией с последующим формированием склеротической рубцовой ткани.

В белом веществе коры головного мозга (рис. 6) изменен рельеф проводящих нервных волокон, глиальные клетки собраны вместе (создавая эффект микседематозного набухания стромы). Их цитоплазма богата включениями гликогена. Этот процесс приводит к резкому снижению функционального состояния пирамидных клеток. В гиппокампе выявляется большое количество интерпозиционных очагов с изменением двухстолбчатого расположения пирамидных клеток.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование этого вида экспериментальной патологии проявляется в возникновении дистрофических изменений в нейронах, являющихся активными клетками коры больших полушарий головного мозга и подкорковых центров. По мере усугубления выраженности нарушений цитоархитектоники коры головного мозга увеличивается количество пирамидных клеток, астроцитов, изменяется расположение границ белого вещества и происходит замещение ткани миелиновыми нервными волокнами. Наблюдается размытость границ расположения пирамидных клеток в ткани коры головного мозга, сами же клетки выглядят тоньше, с резко истонченными отростками апикальных дендритов.

Констатированные патоморфологические изменения в мозговой ткани сопровождаются сосудистыми изменениями головного мозга: уменьшением диаметра просвета сосудов, мукоидным набуханием стенок сосудов, извилистостью, деформацией стенок сосудов и развитием ангиосклероза.

Все эти процессы завершаются атрофическими и склеротическими изменениями мозговой ткани, а также отеком головного мозга.

Полученные данные позволяют полагать, что нарушение полноценной функции щитовидной железы ограничением ее кровоснабжения приводит к развитию патохимических и патоморфологических процессов в ткани головного мозга.

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Agapov P.A., Bogolepova I.N., Malofeeva L.I. Changes in the cytoarchitectonics of field 7 of the cortex of the upperparietal region of the brain of men and women during aging. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2018;3:166–174. (In Russ.)
2. Antipenko E.A., Gustov A.V. Chronic Brain Ischemia. Current State of the Problem. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2016;(19):38–43. (In Russ.)
3. Andrea S. Gore, David Crews, Loretta L. Doen, et al. Endocrine – disrupting chemicals (EDCs): An Introduction. A Guide for Public Interest Organizations and Policy Makers. *CVNRES: An Introduction*, 2014; 80 p.
4. Amonova Z.K., Djurabekova A.T. Neuro-endocrinological aspects in patients with epilepsy. *International Conference on Studies in Humanity. Education and Sciences Helsinki, Finland*. 2022;115–116 p.
5. Paramonova O.V., Shilova L.N. Hypothyroidism in the elderly – methods of diagnosis and treatment. *Medicinal Bulletin*. 2018;2(70):46–53. (In Russ.)
6. Zhitkova Y.V. *Cognitive disorders in chronic cerebral ischemia (prospective study)*. Dissertation. D., Kazan, 2019, 324 p. (In Russ.)
7. Zhukova L.A., Gulamov A.A., Andreeva N.S., Tregubenko E.V. Evaluation of nosological manifestations of subclinical hypothyroidism and conditions with high-normal levels of thyroid hormone. *Modern problems of science and education*. 2017; 5. (In Russ.)
8. Ishunina T.A., Bogolepova I.N., Swaab D.F. Morphofunctional Changes and Compensatory Mechanisms in the Human Brain with Aging and in Alzheimer's Disease. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2020;9(1):77–85. (In Russ.)
9. Kotelnikova G.P., Zakharova N.O. *Clinical and fundamental aspects of gerontology*. Samara: Samara. state. med. univ., 2015;399 p. (In Russ.)
10. Makar R.D., Makar O.R. Thyroid diseases in old age: features of the clinical course, diagnosis and treatment. *International Endocrinology Journal*. 2007;6(12). (In Russ.)
11. Magnaeva A.S., Gulevskaya T.S., Anufriev P.L., et al. Morphological characteristics of the nervous tissue of the brain during aging. *Archive of pathology*. 2022;84(4):20–28.
12. Shomurodova D.S., Dzhurabekova A.T. Clinical and neurological aspects of thyroid function disturbance in the elderly. *European Journal of Interdisciplinary Research and Development*. 2022;2:1–6.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.4.007>  
УДК 611.441:616.001.28/29



Черкасова Ю.Б.<sup>1</sup>✉, Соколова А.И.<sup>1</sup>, Панасенко С.В.<sup>1</sup>, Меньшова А.В.<sup>1</sup>, Савина А.О.<sup>1</sup>,  
Байрамова Н.А. кызы<sup>1</sup>, Яרבалаева Г.К.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт медицины и здоровьесбережения Тамбовского государственного  
университета имени Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

## Оценка морфофункциональных изменений в состоянии межфолликулярной соединительнотканной стромы щитовидной железы после воздействия низкоинтенсивного гамма- излучения: экспериментальное исследование

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция и дизайн исследования – Черкасова Ю.Б., Соколова А.И.; сбор материала, сбор данных литературы – Савина А.О., Байрамова Н.А. кызы; статистическая обработка данных, интерпретация результатов – Савина А.О., Байрамова Н.А. кызы, Яרבалаева Г.К.; написание текста – Черкасова Ю.Б., Соколова А.И.; редактирование текста – Панасенко С.В., Меньшова А.В., Яרבалаева Г.К.

**Благодарности:** авторы выражают особую признательность и огромную благодарность Н.И. Воронину, и. о. директора Института медицины и здоровьесбережения Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина, за бесценный опыт и чуткое наставничество, а также за помощь в проведении исследовательской работы.

Подана: 10.07.2024

Принята: 04.11.2024

Контакты: yulia2011vika@yandex.ru

### Резюме

**Цель.** Провести анализ отдаленных морфофункциональных изменений в межфолликулярной соединительнотканной строме щитовидной железы после воздействия на организм лабораторных животных (крыс) однократного низкоинтенсивного  $\gamma$ -облучения.

**Материалы и методы.** Работа выполнена с соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных в экспериментах на 36 крысах-самцах в возрасте 4 месяцев на момент начала эксперимента. Оценивали реакцию межфолликулярной стромы щитовидной железы после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострadiaционным периодом 12 и 18 месяцев. Критериями оценки служили: морфофункциональные типы тучных клеток и их общее число, эквивалентное содержание фермента щелочная фосфатаза, процент площади стромального компонента по отношению к общей площади ткани щитовидной железы. Статистический анализ полученных данных осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 6.1 (параметрические критерии). Выполнены анализ корреляционных взаимосвязей и регрессионный анализ показателей морфофункционального статуса щитовидной железы.

**Результаты.** Анализ полученных результатов показал морфофункциональные изменения как волокнистого, так и клеточного компонентов соединительнотканной

стромы щитовидной железы. Доля площади стромального компонента относительно площади желез увеличивалась в динамике пострадиационных сроков. Тучные клетки реагировали на воздействие  $\gamma$ -излучения уменьшением их общего числа на фоне возрастания количества дегранулированных форм. Содержание щелочной фосфатазы в межфолликулярной строме снижалось спустя 12 и 18 месяцев после однократного низкоинтенсивного  $\gamma$ -облучения. Проведенный корреляционный анализ между морфофункциональными показателями состояния щитовидной железы показал изменение силы и направления корреляционной зависимости в динамике наблюдения. По результатам множественной линейной регрессии констатированы как разобщенность, так и стабилизация критериев, неразрывно связанных с возрастом.

**Заключение.** Выявлено индуцирующее влияние  $\gamma$ -облучения на увеличение площади межфолликулярной стромы щитовидной железы крыс в эксперименте на фоне снижения ферментативной активности щелочной фосфатазы при участии активных форм тучных клеток. Результаты корреляционного и регрессионного анализов частично пересекаются и демонстрируют утерю многих связей в прямой зависимости от увеличения сроков наблюдения.

**Ключевые слова:** щитовидная железа, межфолликулярная строма, низкоинтенсивное  $\gamma$ -облучение, тучные клетки, щелочная фосфатаза

---

Cherkasova Yu.<sup>1</sup>✉, Sokolova A.<sup>1</sup>, Panasenko S.<sup>1</sup>, Menshova A.<sup>1</sup>, Savina A.<sup>1</sup>, Bayramova N.A. kyzy<sup>1</sup>, Yarbalaeva G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medical Institute of the Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

## Evaluation of Morphofunctional Changes in Interfollicular Connective Tissue Stroma of the Thyroid Gland after Low-Intensity $\gamma$ -Radiation Exposure: An Experimental Study

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** study concept and design of the study – Cherkasova Yu., Sokolova A.; material collection, literature review – Savina A., Bayramova N.A. kyzy; statistical data processing, results interpretation – Savina A., Bayramova N.A. kyzy, Yarbalaeva G.; text writing – Cherkasova Yu., Sokolova A.; editing – Panasenko S., Menshova A., Yarbalaeva G.

**Acknowledgements:** the authors express special appreciation and tremendous gratitude to N. Voronin, Acting Director of the Medical Institute of the Derzhavin Tambov State University, for invaluable experience and empathetic mentoring, as well as for assistance in conducting research work.

Submitted: 10.07.2024

Accepted: 04.11.2024

Contacts: yulia2011vika@yandex.ru

### Abstract

---

**Purpose.** To analyze distant morphofunctional changes in interfollicular connective tissue stroma of the thyroid gland after exposure to a single low-intensity  $\gamma$ -radiation in rats.

**Materials and methods.** The study was carried out in compliance with legal and ethical standards for the use of laboratory animals in experiments, with 36 male rats with an initial



age of 4 months. The response of the interfollicular stroma of the thyroid gland to a single  $\gamma$ -irradiation at a dose equivalent to 5 mSv at 50 cGy/h with a post-radiation period of 12 and 18 months was assessed. The evaluation criteria were: morphofunctional types of mast cells and their total number, equivalent alkaline phosphatase level, stromal component area percent against the total area of the thyroid tissue. Statistical data processing was carried out using Excel 2007 and Statistica 6.1 software packages using parametric criteria. Both correlation analysis and regression analysis of thyroid morphofunctional parameters were performed.

**Results.** Analysis of the results obtained showed morphofunctional changes in both fibrous and cellular components. The proportion of the stromal component area against the area of the glands increased over post-radiation time. Mast cells responded to  $\gamma$ -radiation by decreasing their total number against the background of increase in number of degranulated forms. Alkaline phosphatase levels in interfollicular stroma were decreased in 12 and 18 months after single low-intensity  $\gamma$ -irradiation. The correlation analysis of thyroid morphofunctional parameters showed changes in correlation strength and direction over time within the observation period. Multiple linear regression results indicated both dissociation and/or stabilization of inextricably age-related criteria.

**Conclusion.** An inducing effect of  $\gamma$ -irradiation on increasing the area of interfollicular stroma of experimental rats' thyroid gland against the background of decreasing alkaline phosphatase enzymatic activity with active forms of mast cells involvement was revealed. Correlation and regression analyses results partially intersected demonstrating the loss of many relationships in direct correlation with extension of observation period.

**Keywords:** thyroid gland, interfollicular stroma, low-intensity  $\gamma$ -irradiation, mast cells, alkaline phosphatase

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Радиоактивные частицы природного и техногенного происхождения непрерывно окружают современного человека. При этом искусственные элементы постоянно увеличивают фон радиации эквивалентно расширению сфер использования радиоактивных источников во всех отраслях жизнедеятельности, от ядерной энергетики до медицины, где радионуклиды как образуются в качестве побочных продуктов на постоянной основе, так и массово выбрасываются во время аварийных ситуаций [1–7]. В связи с этим, несмотря на собранный объемный эмпирический материал, интерес к биологическому воздействию факторов радиационной природы на живые организмы не только не теряет своей актуальности, но и приобретает новые аспекты с расширением исследовательского поля [3–6, 8–11].

В изучении эффектов  $\gamma$ -излучения особое внимание следует уделить радиочувствительности органов и тканей, которая не всегда коррелирует с дозой облучения. Регуляторные системы организма, в том числе щитовидная железа как орган эндокринной системы, первостепенно и активно откликаются на воздействие  $\gamma$ -облучения. Установлено, что для щитовидной железы характерна высокая радиочувствительность, ввиду чего ее относят к критическим органам организма. Морфофункциональные изменения в щитовидной железе после воздействия  $\gamma$ -излучения

могут служить идентификатором радиационных эффектов и базой для их углубленного исследования [1, 2, 4].

Представляется важным сделать акцент на изучении отдаленных пострадиационных последствий, особенно в условиях воздействия низкоинтенсивного  $\gamma$ -излучения. В исследовательских работах доказан высокий риск канцерогенеза в щитовидной железе в отдаленные сроки после облучения с длительными латентными периодами, приводящий к возрастанию заболеваемости во времени [3, 5, 7, 11, 12].

Немаловажно в исследовании биологического действия низкоинтенсивного  $\gamma$ -излучения на органы и ткани учитывать их пролиферативную активность. Так, например, щитовидная железа относится к растущим, медленно обновляющимся популяциям, что оказывает значительное влияние на развитие отдаленных по времени пострадиационных изменений в органе из-за накопления структурных трансформаций в геноме [2, 4, 10].

Щитовидная железа имеет бинарную основу строения высокого уровня, в которой паренхиматозный компонент находится в тесной взаимосвязи со стромальным звеном. В отклике щитовидной железы на  $\gamma$ -облучение и адаптивном регулировании радиационных эффектов принципиальное значение имеет реакция соединительной ткани межфолликулярной стромы как сложной системы, в состав которой входят регуляторные клетки. Согласно некоторым исследовательским работам, нарушения органов, опосредованные воздействием ионизирующего излучения, связаны с развитием фиброзных изменений капилляров и стромального компонента, сказывающихся на состоянии местного кровообращения [13–15]. Механизмы пострадиационного ответа стромы формируются при участии ряда биологических компонентов: тучных клеток как регуляторов тканевого гомеостаза, активности фермента щелочной фосфатазы, систем регуляции проницаемости капиллярного микроциркуляторного русла, а также транспорта метаболитов и гормонов, фибробластов, участвующих в образовании волокнистых компонентов. По реакционной выраженности этих компонентов ткани представляется возможным судить об адаптивных пострадиационных возможностях, транспортной способности и особенностях взаимодействия паренхимы и стромального компонента в отдаленные сроки после  $\gamma$ -облучения [4, 6, 11, 13, 14, 16].

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ отдаленных морфофункциональных изменений в межфолликулярной соединительнотканной строме щитовидной железы после воздействия на организм лабораторных животных (крыс) однократного низкоинтенсивного  $\gamma$ -облучения.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена с соблюдением правовых и этических норм участия лабораторных животных в экспериментальных исследованиях (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 об утверждении правил лабораторной практики). Исследование базируется на данных анализа реакции биологического материала модели эксперимента в ответ на воздействие однократной экспозиции  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч на лабораторных половозрелых самцов белых крыс. Были сформированы группы интактных животных и биоконтроля (см. таблицу).



**Модель эксперимента**  
**Experiment model**

Параметры $\gamma$ -излучения		Количество животных	
		Пострадиационный период	
Доза (мЗв)	Мощность (сГр/ч)	12 месяцев	18 месяцев
5	50	9	9
Биоконтроль		9	9
Интактные животные		9	9
Всего животных		54	

Возраст крыс на момент начала эксперимента составлял 4 месяца. Пострадиационный период составил 12 и 18 месяцев. Умерщвление животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом. Объектом экспериментального исследования явилась щитовидная железа. Критериями оценки служили: морфофункциональные типы тучных клеток и их общее число, а также эквивалентное содержание фермента щелочная фосфатаза, оцениваемое по эффекту проявления энзимом функциональной активности.

На базе программы ImageJ производили морфометрию площади щитовидной железы и площади ее межфолликулярной стромы, используя микрофотографии ( $\times 1000$ ) препаратов щитовидной железы 25 полей зрения, окрашенных гематоксилин-эозином. Вычисляли процентное соотношение площадей по формуле:

$$P_{ст} = \frac{S_{ст}}{S_{щж}} \times 100\%,$$

где  $P_{ст}$  – процент площади, занятый межфолликулярной стромой;  
 $S_{ст}$  – площадь межфолликулярной стромы;  
 $S_{щж}$  – общая площадь щитовидной железы.

Для выявления активности щелочной фосфатазы использовали реакцию азосочетания (Берстон М., 1965) на криостатных срезах толщиной 10–12 мкм, с субстратом  $\alpha$ -нафтилфосфатом и красителем прочным синим РР. Морфометрию проводили в 25 полях зрения с каждого микропрепарата ( $\times 400$ ) по программе ImageJ, оценивая в Ps (пикселях) контрастное изображение черного цвета, эквивалентное количественному содержанию щелочной фосфатазы.

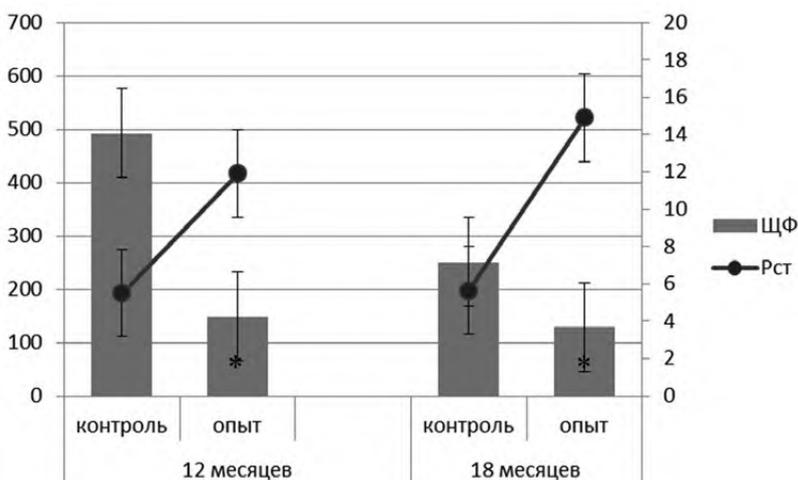
В 60 полях зрения ( $\times 630$ ) микропрепаратов соединительнотканной стромы железы вычисляли количество тучных клеток с идентификацией их дегранулированных и недегранулированных форм, осуществляемой путем сочетанного использования красителей – основного коричневого и гематоксилина (Шубич М.Г., 1961).

Количественные данные, полученные в ходе проведения эксперимента, обрабатывались методами вариационной статистики, корреляционного и регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Excel 2007, Statistica 6.1, SPSS for Windows.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения отклика стромальной соединительной ткани щитовидной железы на воздействие  $\gamma$ -излучения низкой интенсивности в дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с периодом отдаленности 12 и 18 месяцев выявлены морфофункциональные изменения волокнистого и клеточного компонентов. Доля соединительной ткани стромы щитовидной железы контрольных животных составляла 5,51% и 5,65% от общей площади железы спустя 12 и 18 месяцев после  $\gamma$ -облучения соответственно, тогда как в опытной группе животных отмечалась выраженная тенденция к росту стромального компонента в оба пострадиационных срока отдаления, что составило в процентном соотношении 11,92% и 14,9%. Морфометрическое исследование щелочной фосфатазы микроциркуляторного русла щитовидной железы после однократного воздействия  $\gamma$ -излучения показало резкое достоверное снижение ее активности по отношению к контрольным показателям: в начальном сроке исследования – с  $492 \pm 1,5$  Ps в контрольной группе до  $149 \pm 4,2$  Ps; в опытной группе спустя 18 месяцев после  $\gamma$ -облучения с  $251 \pm 2,1$  Ps до  $129 \pm 6,7$  Ps соответственно (рис. 1).

На фоне увеличения площади соединительной ткани и уменьшения содержания щелочной фосфатазы отмечалось достоверное снижение общего числа тучных

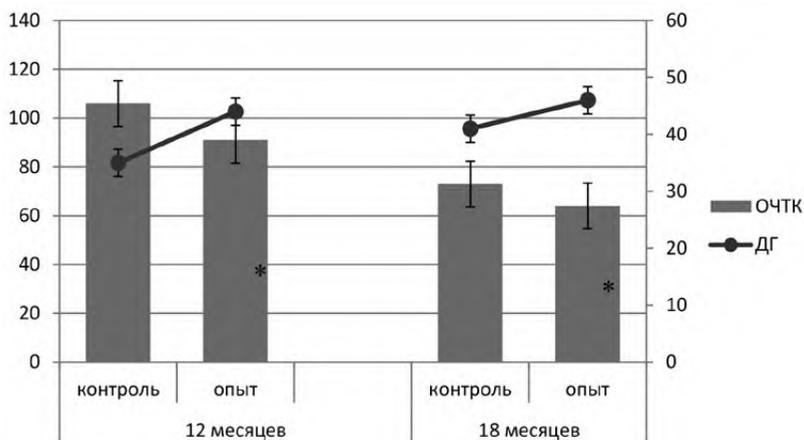


**Рис. 1.** Динамика содержания щелочной фосфатазы и площади стромального компонента щитовидной железы после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострадиационным периодом 12 и 18 месяцев. Обозначения: по оси абсцисс – сроки наблюдения, по левой оси ординат – содержание щелочной фосфатазы в пикселях, по правой оси ординат – процент площади, занятый межфолликулярной стромой

Примечание: \* различия при сравнении с контрольной группой статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Evolution of alkaline phosphatase levels and thyroid stromal component area after a single  $\gamma$ -irradiation exposure in the dose of 5 mSv at 50 cGy/h, with post-radiation periods of 12 and 18 months. Designations: x-axis indicates observation periods, left y-axis indicates alkaline phosphatase level in pixels, and right y-axis indicates the percentage of interfollicular stroma area

Note: \* differences when comparing with the control group are statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Рис. 2.** Динамика общего числа тучных клеток межфолликулярной соединительнотканной стромы щитовидной железы и их дегранулированных форм после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострadiационным периодом 12 и 18 месяцев. Обозначения: по оси абсцисс – сроки наблюдения, по левой оси ординат – общее число тучных клеток, по правой оси ординат – содержание дегранулированных форм тучных клеток в процентах

Примечание: \* различия при сравнении с контрольной группой статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Evolution of the total number of mast cells of the interfollicular connective tissue stroma of the thyroid gland and their degranulated forms after a single  $\gamma$ -irradiation exposure in the dose of 5 mSv at 50 cGy/h, with post-radiation periods of 12 and 18 months. Designations: x-axis indicates observation periods, left y-axis indicates the total count of mast cells, and right y-axis indicates degranulated mast cell forms content in percent

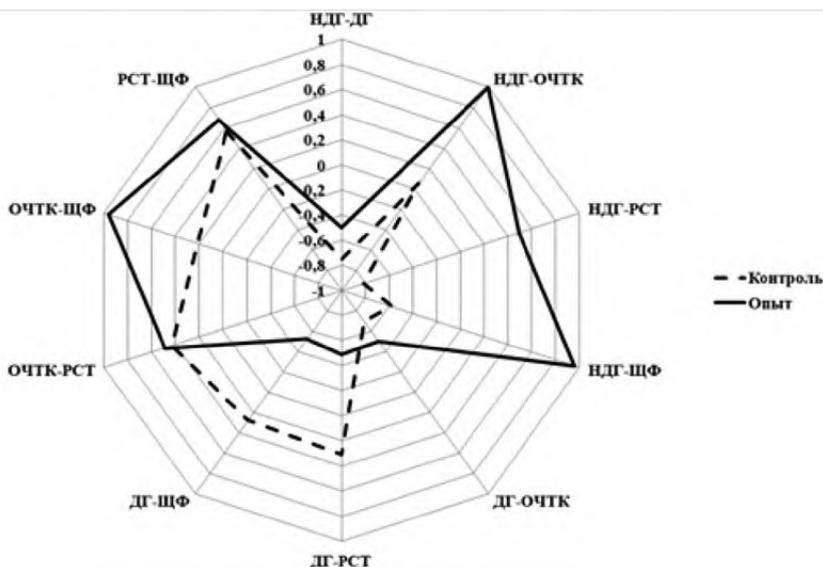
Note: \* differences when comparing with the control group are statistically significant ( $p < 0.05$ ).

клеток по отношению к контролю: на 14,2% в срок после воздействия  $\gamma$ -излучения 12 месяцев и 12,3% – спустя 18 месяцев. Рекомбинация типологических представителей тучных клеток была направлена в сторону их активации и сопровождалась прогрессирующим преобладанием дегранулированных форм к сроку наблюдения 18 месяцев на фоне снижения количества недегранулированных тучных клеток (рис. 2).

По результатам корреляционного анализа показателей морфофункционального состояния щитовидной железы экспериментальных животных после  $\gamma$ -облучения (доза 5 мЗв, мощность 50 сГр/ч) с пострadiационным периодом 12 месяцев в контрольной группе животных была выявлена сильная обратная связь по критериям недегранулированных и дегранулированных тучных клеток ( $r = -0,755$ ), которая сохраняется у животных опытной группы, но теряет свою силу ( $r = -0,5$ ). Сильная обратная связь по критериям содержания недегранулированных тучных клеток и площади соединительнотканной стромы ( $r = -0,820$ ) в контрольной группе животных трансформируется в прямую корреляционную связь умеренной силы для показателей животных опытной группы. Обратная связь средней силы, констатированная между содержанием недегранулированных тучных клеток и щелочной фосфатазы

контрольной группы ( $r=-0,582$ ), переходит в сильную прямую связь по аналогичным показателям опытной группы ( $r=0,957$ ). Корреляционная связь количества дегранулированных тучных клеток и общего числа тучных клеток ( $r=-0,693$ ) незначительно снижается в группе контроля. Прямая связь средней силы, сформированная между проявлением активности щелочной фосфатазы и площадью соединительнотканной стромы ( $r=0,564$ ), достоверно усиливается в контрольной группе ( $r=0,681$ ). Кроме того, морфологические критерии щитовидной железы опытной группы отреагировали на воздействие ионизирующего излучения формированием новых сильных прямых связей между общим количеством тучных клеток и их неактивных форм ( $r=1$ ) и между числом тучных клеток и активностью щелочной фосфатазы. Формирование обратной связи умеренной силы наблюдалось между числом дегранулированных тучных клеток и показателями проявления активности щелочной фосфатазы (рис. 3).

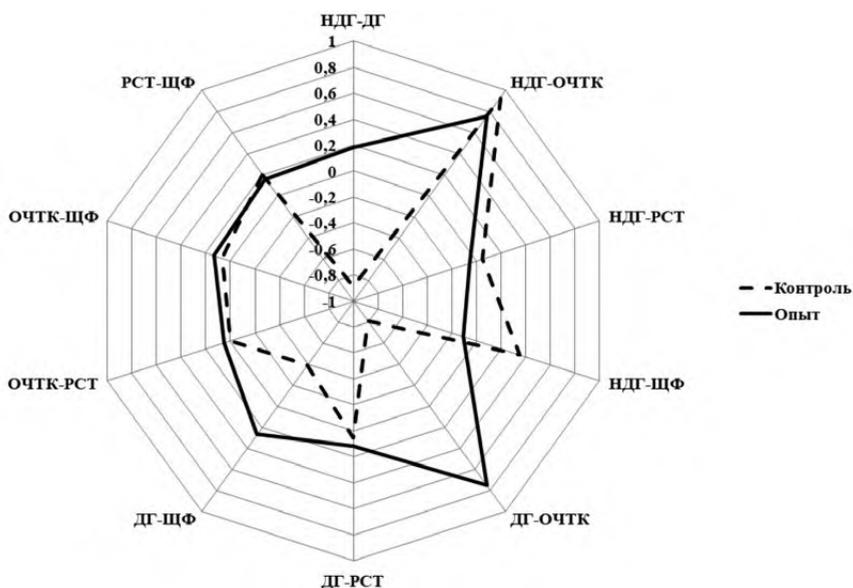
Спустя 18 месяцев в контрольной группе животных часть корреляционных связей исчезает или становится минимальной, сохраняясь и достоверно усиливаясь для критериев недегранулированных и дегранулированных тучных клеток ( $r=-0,889$ ) и активных форм тучных клеток с их общим числом ( $r=-0,812$ ); при этом формируется новая сильная связь по показателям общего количества тучных клеток



**Рис. 3. Корреляционный анализ показателей морфофункционального состояния щитовидной железы после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострадиационным периодом 12 месяцев**

Примечания: ОЧТК – общее число тучных клеток, ДГ – дегранулированные тучные клетки, НДГ – недегранулированные тучные клетки, ЩФ – щелочная фосфатаза, РСТ – процент площади, занятой межфолликулярной стромой щитовидной железы.

**Fig. 3. Correlation analysis of indicators of the morphofunctional state of the thyroid gland after a single  $\gamma$ -irradiation exposure in the dose of 5 mSv at 50 cGy/h, with post-radiation period of 12 months**



**Рис. 4. Корреляционный анализ показателей морфофункционального состояния щитовидной железы после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострadiационным периодом 18 месяцев**

Примечания: ОЧТК – общее число тучных клеток, ДГ – дегранулированные тучные клетки, НДГ – недегранулированные тучные клетки, ЩФ – щелочная фосфатаза, РСТ – процент площади, занятой межфолликулярной стромой щитовидной железы.

**Fig. 4. Correlation analysis of the thyroid gland morphofunctional state indicators after a single  $\gamma$ -irradiation exposure in the dose of 5 mSv at 50 cGy/h, with post-radiation period of 18 months**

и недегранулированных клеток ( $r=0,934$ ). У животных опытной группы сохраняется прямая связь между общим числом тучных клеток и их недегранулированных форм ( $r=0,758$ ), тогда как связь между суммарным количеством тучных клеток и их дегранулированных форм становится обратной и достоверно усиливается ( $r=0,756$ ) (рис. 4).

Проведенный корреляционный анализ между морфофункциональными показателями состояния щитовидной железы показал изменение силы и направления корреляционной зависимости в динамике наблюдения.

Для выявления степени связи исследуемых морфофункциональных критериев щитовидной железы с показателями динамики разрастания соединительнотканной стромы щитовидной железы был проведен множественный регрессионный анализ (линейная регрессия). Зависимой величиной была площадь рыхлой соединительной ткани стромы щитовидной железы, а независимыми переменными – такие параметры, как активность щелочной фосфатазы тироидного эпителия, общее число тучных клеток, а также количество их дегранулированных и недегранулированных форм.

Результаты регрессионного анализа показателей у животных контрольной группы, соответствующей пострadiационному периоду времени 12 месяцев после облучения, показали адекватность регрессионной модели и достаточность используемых

параметров, о чем свидетельствует удовлетворительная точность аппроксимации при значении коэффициента детерминации R-квадрат=0,89 (или 89%), а также достоверность модели по уровню значимости критерия Фишера: значимость  $F=0,034586$ . Если рассматривать уровень влияния каждой независимой переменной, то коэффициент для показателя количества недегранулированных тучных клеток составил 1,35 ( $p<0,05$ ), для дегранулированных тучных клеток – 0,97 ( $p<0,05$ ), для общего числа тучных клеток – 1,10, для активности щелочной фосфатазы – -0,13 ( $p>0,05$ ). Это свидетельствует о достоверной зависимости изменения площади соединительной ткани от общего числа тучных клеток и изменения соотношения их морфофункциональных типов, тогда как показатель содержания щелочной фосфатазы не оказывает влияния на исследуемую переменную.

Для опытной группы животных выбранная модель и количество исследуемых критериев также являются приемлемыми – при коэффициенте детерминации R-квадрат=0,809, или 80,9% (удовлетворительный уровень аппроксимации), значимости  $F=0,0442$ , что свидетельствует о достоверности выбранной модели. Коэффициенты уравнения регрессии для независимых переменных составили: для количества недегранулированных тучных клеток 0,003 ( $p>0,05$ ), для дегранулированных тучных клеток –1,21 ( $p<0,05$ ), для общего числа тучных клеток –2,34 ( $p<0,05$ ), для проявления активности щелочной фосфатазы 1,31 ( $p<0,05$ ). Следовательно, площадь межфолликулярной соединительнотканной стромы щитовидной железы находится в зависимости прямого характера от проявления активности щелочной фосфатазы тироидного эпителия и в обратной зависимости от общего количества тучных клеток и их активных форм.

Модель множественной линейной регрессии для аналогичных показателей морфофункционального состояния щитовидной железы после однократного  $\gamma$ -облучения в эквивалентной дозе 5 мЗв с мощностью 50 сГр/ч с пострadiационным периодом 18 месяцев как для контрольной (R-квадрат=0,114, значимость  $F=0,932$ ), так и для опытной (R-квадрат=0,037, значимость  $F=0,992$ ) групп показала свою не состоятельность, так как точность аппроксимации недостаточна и требуется введение дополнительных независимых переменных. Коэффициенты уравнения регрессии для всех независимых переменных находились на уровне от 0,024 до 0,081 при  $p>0,05$ , что также свидетельствует об отсутствии достоверного влияния независимых переменных на зависимую, а именно на площадь межфолликулярной соединительнотканной стромы щитовидной железы.

Таким образом, анализируя результаты множественной линейной регрессии, можно сказать о том, что имеет место разобщенность критериев (или наоборот – их стабилизация), которая неразрывно связана с возрастом.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ морфофункциональных изменений межфолликулярной стромы щитовидной железы показал активный отклик компонентов соединительной ткани в ответ на воздействие однократного низкоинтенсивного  $\gamma$ -излучения в отдаленные пострadiационные периоды. Гамма-облучение вызывает увеличение площади стромальной интерфолликулярной соединительной ткани щитовидной железы лабораторных животных на фоне снижения ферментативной активности щелочной фосфатазы, отражающей участие активных форм тучных клеток. Результаты корреляционного и



регрессионного анализа частично пересекаются и показывают утерю многих связей, отражающих прямую зависимость отмеченных биологических эффектов от увеличения сроков наблюдения. Полученные результаты являются базовой основой для осуществления дальнейшего поиска новых критериев, отражающих влияние воздействия низкоинтенсивного  $\gamma$ -излучения на межфолликулярную соединительно-тканную строму щитовидной железы.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dudareva Yu., Gurieva V. Evaluation of Thyroid in Women Are at Risk Radiation Exposure and Their Descendants in Two Generations. *Human Ecology*. 2015;10: 9–13. (in Russian)
2. Izatova A., Roslyakova E., Alipbekova A., Esetova K., Kantureeva G. Study and evaluation of course ososbenno thyroid pathology population southern regions of eastern-kazakhstan region subjected to irradiation at a nuclear weapons tests. *International journal of applied and fundamental research*. 2017;2:190–192. (in Russian)
3. Lazarev A., Shoikhet Ya., Pisareva L., Petrova V., Terekhova S. The factor of ionizing radiation and thyroid cancer in women in the altai krai. *Russian Journal of Oncology*. 2017;22(4):224–228. doi: 10.18821/1028-9984-2017-22-4-224-228 (in Russian)
4. Logacheva V. Some laws in the thyroid gland reactions on  $\gamma$ -irradiation. *Journal of new medical technologies*. 2016;23(3):159–163. doi: 10.12737/21762 (in Russian)
5. Ivanov V. *Medical radiological consequences of Chernobyl: prognosis and actual data after 30 years*. Moscow: GEOS; 2015:449. (in Russian)
6. Spiridonov S., Karpenko E., Mikailova R. Radioecological risks associated with normalized and accidental emissions from nuclear fuel cycle enterprises. *VII Congress on Radiation Research (Radiobiology, Radioecology, Radiation Safety): abstracts of the reports*. October 21–24, 2014. Moscow: RUDN. 2014:335. (in Russian)
7. Ron E., Lubin J.H., Shore R.E. et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *J. Rad. Res*. 1995;141(3):259–277.
8. Zavarykina T. *Structural changes in DNA under the action of low-intensity ionizing radiation in small doses* (PhDThesis). Moscow; 2008:26. (in Russian)
9. Porovsky Ya. *Clinical and functional features of visceral disease in persons exposed to low doses of ionizing radiation* (PhDThesis). Tomsk; 2014:292. (in Russian)
10. Raskosha O., Bashlykova L. Genetic effects in somatic cells of mice exposed to chronic low dose  $\gamma$ -irradiation, and their progeny. *Proceedings of the Komi science centre ural branch russian academy of sciences*. 2016;4(28):55–59. (in Russian)
11. Raskosha O., Ermakova O. Assessment of the condition of the follicular epithelium of the thyroid gland of small mammals under chronic low-dose radiation. *VII Congress on Radiation Research (Radiobiology, Radioecology, Radiation Safety): abstracts of the reports*. October 21–24, 2014. Moscow: RUDN; 2014:51. (in Russian)
12. Baleva L., Danilycheva L., Karakhan N. Assessment of the dynamics of the thyroid gland in children exposed to radionuclides as a result of the Chernobyl accident. *VII Congress on Radiation Research (Radiobiology, Radioecology, Radiation Safety): abstracts of the reports*. October 21–24, 2014. Moscow: RUDN; 2014:19. (in Russian)
13. Petin V., Pronkevich M. Analysis of effects of low dose radiation on cancer incidence. *Radiation and Risk*. 2012;21(1):39–57. (in Russian)
14. Cherkasova Yu. *Model representation of the morphofunctional state of the peripheral endocrine glands in conditions of remoteness of the consequences  $\gamma$ -irradiation* (PhD Thesis). Tula; 2009:152. (in Russian)
15. Chumachenko P. Thyroid gland: indicator of epithelium and stroma contact area. *Advances in current natural sciences*. 2010;1:24–26. (in Russian)
16. Logacheva V., Zolotareva S. Peculiarities of parychemato-stromal interactions in thyroid gland under the influence of the factors of radiation nature. *Journal of new medical technologies, eEdition*. 2018;6:315–320. (in Russian)



Sameerah Ahmed Zearah✉, Fatima Saiwan Sabah  
College of Science, University of Basrah, Basrah, Iraq

## Estimation Anticancer, Antioxidant and Antibacterial Effect of Alkaloid Extract Isolated From Terminalia Chebula Retz. Fruits

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Sameerah Ahmed Zearah – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, validation, visualization; Fatima Saiwan Sabah – conceptualization, project administration, resources, software, visualization.

**Funding and Acknowledgements:** the authors wish to thank the University of Basrah, College of Science, Chemistry Department for their financial support.

**Author's statement:** the authors declare that this article is original and any responsibility for its content lies with them. The article is published in the author's edition.

Submitted: 22.06.2024

Accepted: 17.10.2024

Contacts: sameera.zearah@uobasrah.edu.iq

### Abstract

**Introduction.** The fruits of Terminalia chebula Retz. contain biologically active substances of a various chemical nature, including alkaloids, which are commonly used for the medicinal products manufacturing. The technology of alkaloids extraction from Terminalia chebula Retz. fruits has been elaborated and the possibility of their use for medicinal products manufacturing has been scientifically substantiated.

**Purpose.** To elaborate a technology for extracting alkaloids from Terminalia chebula Retz. fruits and to substantiate scientifically the possibility of their use as antibacterial, antioxidant and anticancer agents.

**Materials and methods.** Terminalia chebula Retz. fruits were dried and the alkaloids were extracted from the dried fruits as a yellow-brown colored substance. This extract was subjected to standard phytochemical qualitative tests using Aldrich reagents. The first step consisted in extracting alkaloids from 50 grams of primary product using acetic acid ethanolic solution. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated. The substance obtained during the subsequent isolation and concentration procedures was yellow-brown in color and corresponded to 0.735 grams of Terminalia chebula Retz. fruits. The second stage was the identification of steroids, terpenoids, and flavonoids using standard phytochemical methods. At the subsequent, third stage, the thin-layer chromatography (TLC) method was applied for fractionation of alkaloids in the studied extract followed by identifying the isolated fractions and staining them with Dragendorff's reagent. The quantification of isolated fractions was performed using both PyE-UNICAM-30300S Infra-red spectrophotometer and UV-Visible spectrophotometer on JASCO UV. The antibacterial activity against both gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria was assessed. The antioxidative capacity was evaluated by antioxidant activity quantification by S.F.A. Zearah (2024). The study principle elaborated and published by the group of authors (A.M. Al-Shammari et al.) in 2015 was used to evaluate the anticancer activity (by MTT test). A combined cytotoxic assay was also performed.



**Results.** The standard qualitative analysis revealed the presence of alkaloids and phenol, and the results of thin layer chromatography (TLC) showed the presence of one of a number of alkaloid components with retention factor (Rf) of 0.206. The extract exhibited activity against gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria at a minimal inhibitory concentration of 2 g/l and 4 g/l, respectively. The antioxidant activity of the alkaloid extract was 64.5% compared to that of butylhydroxytoluene (BHT) with 77.5%. The results of the alkaloid extract using MTT test demonstrated that it exhibited anticancer activity (MCF-7 cell line) at the concentration of 1 g/L, inhibiting cell growth by 37.63%.

**Conclusion.** The study concluded presence of one alkaloid compound in the extract by using thin layer chromatography. The extract showed higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) compared to Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*).

**Keywords:** alkaloid, antioxidant, antibacterial, anticancer, *Terminalia chebula* Retz.

Самира Ахмед Зеара✉, Фатима Сайван Сабах  
Научный колледж, Университет Басры, Басра, Ирак

## Оценка противоопухолевого, антиоксидантного и антибактериального эффектов алкалоидного экстракта, выделенного из плодов *Terminalia chebula* Retz.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Самира Ахмед Зеара – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка результатов, визуализация; Фатима Сайван Сабах – концепция, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, визуализация.

**Финансирование и благодарности:** авторы хотели бы поблагодарить Университет Басры, Научный колледж, химический факультет за финансовую поддержку.

**Заявление авторов:** авторы заявляют, что данная статья является оригинальной и любая ответственность, связанная с ее содержанием, возложена на них.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 22.06.2024

Принята: 17.10.2024

Контакты: sameera.zearah@uobasrah.edu.iq

### Резюме

**Введение.** Плоды *Terminalia chebula* Retz. содержат в своем составе биологически активные вещества разной химической природы, в том числе алкалоиды, которые принято использовать для производства лекарственных средств. Разработана технология извлечения алкалоидов из плодов *Terminalia chebula* Retz. и научно обоснована возможность их использования для приготовления лекарственных препаратов.

**Цель.** Разработать технологию извлечения алкалоидов из плодов *Terminalia chebula* Retz. и научно обосновать возможность их использования в качестве антибактериальных, антиоксидантных и противоопухолевых агентов.

**Материалы и методы.** Плоды *Terminalia chebula* Retz. подвергали высушиванию с последующим выделением из них алкалоидов в виде субстанции желто-коричневого цвета. Данный экстракт подвергали стандартному качественному фитохимическому анализу с использованием реагентов производства компании Aldrich. Первый этап работы состоял в экстракции алкалоидов из 50 грамм исходного продукта с использованием этанольного раствора уксусной кислоты. Смесь подвергали фильтрованию с последующим концентрированием фильтрата. Полученная в ходе проведения последующих процедур выделения и концентрирования субстанция имела желто-коричневый цвет и соответствовала 0,735 грамма плодов растения *Terminalia chebula* Retz. Вторым этапом выполнения работы явилась идентификация стероидов, терпеноидов, флавоноидов с использованием стандартных фитохимических методов определения. На последующем, третьем этапе был применен метод тонкослойной хроматографии для фракционирования алкалоидов в исследуемом экстракте с последующей идентификацией выделенных фракций и окрашиванием их реактивом Драгендорфа. Количественная оценка выделенных фракций производилась с применением как инфракрасного спектрофотометра PyE-UNICAM-30300S Infra-red spectrophotometer, так и ультрафиолетового спектрофотометра UV-Visible spectra on JASCO UV. Осуществлена оценка антибактериальной активности по отношению к грамположительным (золотистый стафилококк) и грамотрицательным (кишечная палочка) бактериям. Антиоксидантный потенциал оценивался методом количественного определения антиоксидантной активности по S.F.A. Zearah (2024). Для оценки антираковой активности (по МТТ-тесту) использовался принцип исследования, опубликованный группой авторов (А.М. Al-Shammari et al.) в 2015г. Производился также комбинированный цитотоксический анализ.

**Результаты.** Использование стандартного качественного анализа позволило выявить наличие алкалоидов и фенола, а результаты применения тонкослойной хроматографии показали наличие одного из ряда алкалоидных компонентов с коэффициентом удерживания (Rf), равным 0,206. Экстракт проявлял активность в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий в минимальной ингибирующей концентрации 2 г/л и 4 г/л соответственно. Антиоксидантная активность алкалоида составила 64,5%, тогда как ВНТ проявил более высокую активность – 77,5%. Результаты исследования экстракта алкалоидов с использованием МТТ-теста показали, что он проявляет противоопухолевую активность (клеточная линия MCF-7) в концентрации 1 г/л, подавляя рост клеток на 37,63%.

**Заключение.** Исследование методом тонкослойной хроматографии показало наличие в анализируемом экстракте алкалоидных соединений. Установлено проявление экстрактом высокой антибактериальной активности в отношении как грамположительных (*Staphylococcus aureus*), так и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*).

**Ключевые слова:** алкалоид, антиоксидантный, антибактериальный, противоопухолевый, *Terminalia chebula* Retz.

---

## ■ INTRODUCTION

Alkaloids are groups of homogeneous substances that do not have a uniform composition, they are complex basic organic compounds. The structure of alkaloids



contains one or more nitrogen atoms linked in heterogeneous rings. The alkaloid may contain carbon, hydrogen, and oxygen. They are crystalline solids, except for alkaloids that do not contain oxygen. Liquid, like nicotine. Most alkaloids are colorless and odorless, with a bitter taste [1]. A few alkaloids are colored such as berberine, it is yellow in color. Free alkaloids dissolve in organic solvents such as chloroform and ether, but do not dissolve in water. Salt of alkaloids dissolve in water and do not dissolve in organic solvents. This bases a few alkaloids such as caffeine. All free alkaloids are basic, and therefore their solution is alkaline while the solution of their salts acidic [2, 3].

Alkaloids are characterized by their combination with metal salts to form double complex salts that are insoluble in water and thus precipitate in a neutral or weakly acidic medium. In the form of crystals. They are considered final products of the reactions of toxic substances in plants, which are then eliminated a form of alkaloids that are harmless to the plant and are preserved in its various parts. Some alkaloids affect plant life as growth regulators, such as citric acid. Alkaloids are considered a storehouse of elements that the plant may need in its various stages of growth. They can be used whenever they are needed, and the most important of these elements is nitrogen [4].

The ellipse (*Terminalia chebula* Retz.) has different tropical deciduous trees of the genus (*Terminalia*), which includes about 100 species distributed in tropical regions of the world, and is a member of the Combretaceae family, or what is also called the Indian almond family (Combretaceae) [5]. It contains anthraquinones, resins, and saponins, and it also contains amino acids and phosphoric acid. Halic acid is an antioxidant that has many uses in the field of medicine, the most important of which is its use as an immunosuppressant. It stimulates and protects the liver, expels toxins, and eliminates waste from the intestines. It also inhibits the alpha-glucosidase enzyme, which is found in the human stomach and has an important role in diabetes studies. Its activity against *Staphylococcus aureus* has been proven [6, 7], and *Candida albicans*. It regulates bowel movement without irritating it, and cleans the internal digestive system, especially the colon, in moderation. The tannic acid in the fruit protects against intestinal inflammation, reduces intestinal secretions, treats indigestion, high acidity, heartburn, and cases of esophageal reflux, and is an anti-diarrheal agent for chronic diarrhea [8, 9].

Traditional medicine draws upon centuries of belief, observations, and analysis, forming the basis for the evolution of modern medicine. Currently, there is considerable enthusiasm for herbal medications [10]. The utilization of plants and plant-derived substances in medicines is gaining popularity due to the cost-effectiveness and natural origin of herbal remedies, offering higher safety margins and often fewer or no side effects. *Terminalia chebula* Retz., a member of the Combretaceae family, holds significant importance in the medicinal practices of Ayurveda, Siddha, Unani, and Homeopathy. Referred to as the "King of Medicines" in Tibet, it occupies the top position in the Ayurvedic material medica due to its exceptional wound-healing capabilities and a broad spectrum of medicinal properties [6, 11].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To elaborate a technology for extracting alkaloids from *Terminalia chebula* Retz. fruits and to substantiate scientifically the possibility of their use as antibacterial, antioxidant and anticancer agents.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### **Plant Fruits**

The dried fruit of Terminalia chebula Retz. was bought from a nearby herbal market in Basrah city. Subsequently, it was ground using an electric grinder and stored in a sealed glass container during its utilization. A voucher specimen number (BSRASCI00621) was provided for future referencing purposes.

### **Chemical Material**

All reagents and solvents were purchased from Aldrich company.

### **Alkaloid Extract of Terminalia Chebula Retz. Fruits**

50 grams of defatted Terminalia chebula Retz. fruits powder was mixed with 300 milliliters of 10% ethanolic acetic acid with continuous stirring at room temperature for 4 hours. The mixture was filtered, the filtrate was concentrated using a rotary evaporator. The concentrated filtrate was treated with concentrated ammonia until the pH=9. A precipitate was formed and separated from the filtrate by filtration using a Büchner funnel and Whatman No. 541 filter paper. The precipitate was dissolved in 70% ethanol acidified with acetic acid. The filtrate was also treated with chloroform using a separating funnel. The chloroform layers were collected and allowed to dry at room temperature. A viscous yellow-brown substance weighing 0.735 grams was obtained [12].

### **Phytochemicals Qualitative Tests**

Several preliminary qualitative tests, including Molisch for carbohydrates, Benedict for glycosides, Dragendorff for alkaloids, Stable foam for saponins, Liebermann-Burchard for steroids, Salkowsky for terpenoids, FeCl<sub>3</sub> for phenolic compounds, and Shinoda for flavonoids, were conducted on eggplant peel extract following standard procedures to identify the presence of these phytochemical compounds [13, 14].

### **Thin Layer Chromatography (TLC)**

Thin-layer chromatography (TLC) was performed on the alkaloids extract, applying them 1cm from the base of a silica gel plate (2×10 cm). Chromatogram development took place in a sealed tank, saturated with a mixture of [sec-butanol – formic acid – water (7.7 – 1 – 1.3)]. Following this, Dragendorff reagent was employed to stain the plate, enabling the visualization of alkaloids based on their color interactions and retention factors (R<sub>f</sub>).

### **Infrared and UV-Visible Spectroscopy**

IR spectra using PyE-UNICAM-30300S Infra-red spectrophotometer and UV-Visible spectra on JASCO UV.

### **Antibacterial Activity of Alkaloid Extract**

Antibacterial activity and minimum inhibition concentration (MIC) were evaluated against of Gram positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*) bacteria, by agar well diffusion method which afford testing on Muller-Hinton agar plates. Prepared various concentration (250, 125, 62, 32, 16, 8, 4, 2, 1 g/l) from alkaloid extract of Terminalia chebula Retz. fruits dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO). Holes were made

in the inoculated agar by using a cork borer and fill with extract and DMSO as control. All the plates were incubated at 37 °C for 24 hours, antibacterial activity was indicated by clear zone of growth inhibition [15, 16].

### **Antioxidant Activity of Alkaloid Extract**

0.02 mL of Linoleic acid, 0.2 mL tween 20 and 1 mL of  $\beta$ -carotene (0.1 g/l in chloroform) were mixed in round flask of (100 mL). Chloroform was eliminated at room temperature and away from sunlight, and then added (50 mL) of distilled water to mixture and shaken. 3.8 mL of the mixture was then mixed with 0.2 mL of alkaloid extract at concentration (100 g/l) or butylated hydroxy toluene (BHT) as standard compound, the control consists of 0.2 mL Dimethyl Sulphoxide instead of extract or standard. The absorbance at zero time was read in 470 nm, the samples were then subjected to thermal autoxidation at 45 °C with constant water bath temperature for 2h. Absorbance was measured at each 15min for time periods stretched between (105-15) min. The alkaloid extract efficacy was then compared with the efficacy of BHT based on the graph between absorbance and time at the same wavelength [17]. Equation 1 was used to calculate the antioxidant activity (AA):

$$\% AA = 1 - [(A_i - A_t) / (A_i^* - A_t^*)] \times 100, \quad (1)$$

where  $A_i$  – absorbance value at zero time of sample;

$A_t$  – absorbance value after incubation (105) min of sample at 45 °C;

$A_i^*$  – absorbance value at zero time of control;

$A_t^*$  – absorbance value after incubation (105) min of control at 45 °C.

### **Anticancer activity by MTT-assay**

#### **Methods**

#### **Maintenance of Cell Cultures**

The MCF-7 cancer cell line was acquired from the IRAQ Biotech Cell Bank Unit in Basrah and cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Cell passages were performed using Trypsin-EDTA, with reseeding conducted when cells reached 50% confluence twice a week. The cells were incubated under conditions of 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> [18].

#### **Combination Cytotoxicity Assays**

To assess the cytotoxic effect of the alkaloid extract obtained from the fruits of *Terminalia chebula* Retz., the MTT cell viability assay was carried out in 96-well plates. MCF-7 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well. After 24 hours or upon achieving a confluent monolayer, the cells were exposed to the alkaloid extract at concentration 1000  $\mu$ g/mL. Following 72 hours of treatment, cell viability was assessed by removing the medium, adding 28  $\mu$ L of a 2 g/l MTT solution, and incubating the cells for 2 hours at 37 °C. After discarding the MTT solution, the remaining crystals were dissolved by adding 100  $\mu$ L of Dimethyl Sulphoxide and incubating the cells at 37 °C for 15 minutes with shaking [19]. The absorbance was measured using a microplate reader at 620 nm, and the assay was conducted in triplicate. The inhibition rate of cell growth (percentage of cytotoxicity) was calculated using the following equation [20]:

$$\text{Proliferation rate as PR} = (B/A) \times 100, \quad (2)$$

where A – the mean optical density of untreated wells;  
B – the optical density of treated wells.

$$\text{Inhibition rate IR} = 100 - \text{PR}. \quad (3)$$

## ■ RESULTS

### Qualitative Analysis of Alkaloids Extract

Qualitative analysis of Terminalia chebula fruits alkaloid extract, as presented in Table 1, yielded a positive result with Dragendorff reagent and 1% FeCl<sub>3</sub>, confirming the presence of alkaloid and phenol. Tests for flavonoids, terpenoids, tannins, saponins, carbohydrates, and glycosides yielded a negative result, suggesting the absence of these chemical components in the isolated alkaloid extract. Figure 1 shows the results of the thin layer chromatography (TLC) test of the alkaloid extract, which was carried out through the use of a mobile phase system (solvent) consisting of (Sec. butanol – Formic acid – water) at ratio (7.7 – 1.3 – 1) mL. The figure showed the presence of one alkaloid compound and it has a retardation coefficient (Rf) = 0.206.

**Table 1**  
**Qualitative investigation of the alkaloid extract from Terminalia chebula Retz. fruits**

Phytochemical content	Results of extract
Carbohydrates	–
Glycosides	–
Alkaloids	+
Steroids	–
Terpenoids	–
Saponines	–
Phenolic compounds	+
Flavonoids	–

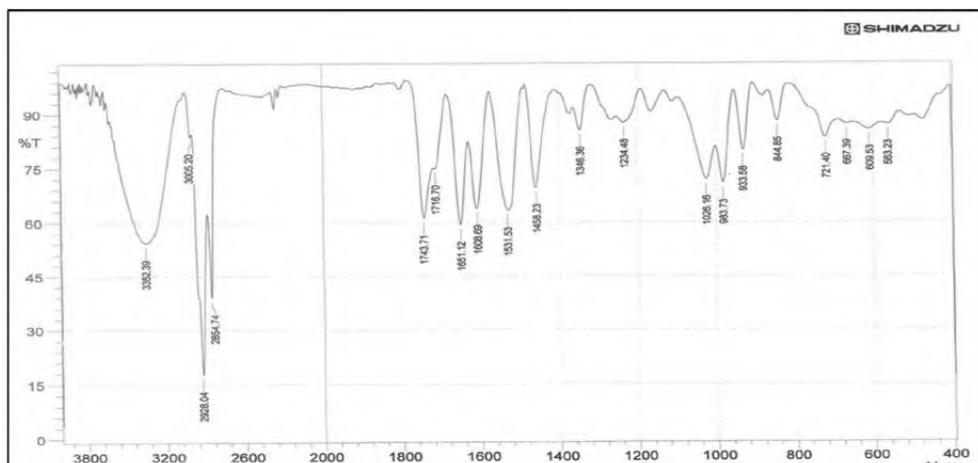


**Fig. 1. Thin layer chromatography (TLC) for alkaloid extract**

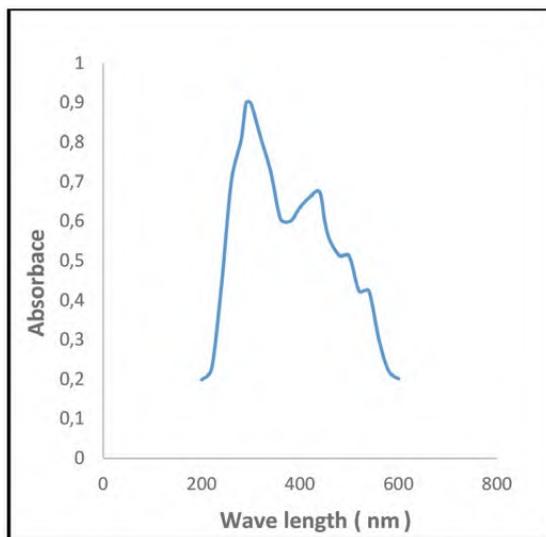


**Table 2**  
**Important infrared vibration bands of alkaloid extract**

Band Compound	OH	C-H	C=N	C=O	C=C aromatic	C-O
Alkaloid compound	3352 cm <sup>-1</sup> Broad Stretching	2928 cm <sup>-1</sup> Strong Stretching	1743cm <sup>-1</sup>	1651 cm <sup>-1</sup>	1608 cm <sup>-1</sup> Sharp	1026 cm <sup>-1</sup>



**Fig. 2.** IR spectrum of alkaloid extract



**Fig. 3.** UV-Visible spectrum for alkaloid extract

### Infra-Red and UV-Vis

Figure 2 and Table 2 show the most important bands appearing in the infrared spectrum of the alkaloid compound. The band appearing at frequency  $3352\text{ cm}^{-1}$  belongs to the hydroxyl group, while the band at  $2928\text{ cm}^{-1}$  indicates the stretching of the C – H bond. The band at frequency 1743 also showed the presence of N belonging to the alkaloid compound through the C=N bond. The bands appearing at frequencies  $1608\text{ cm}^{-1}$  and  $1026\text{ cm}^{-1}$  belong to the C=C and C-O bonds, respectively, which indicate that the compound is aromatic, this is consistent with the results of the preliminary qualitative tests through the detection of phenol by  $\text{FeCl}_3$ , which gave a positive result.

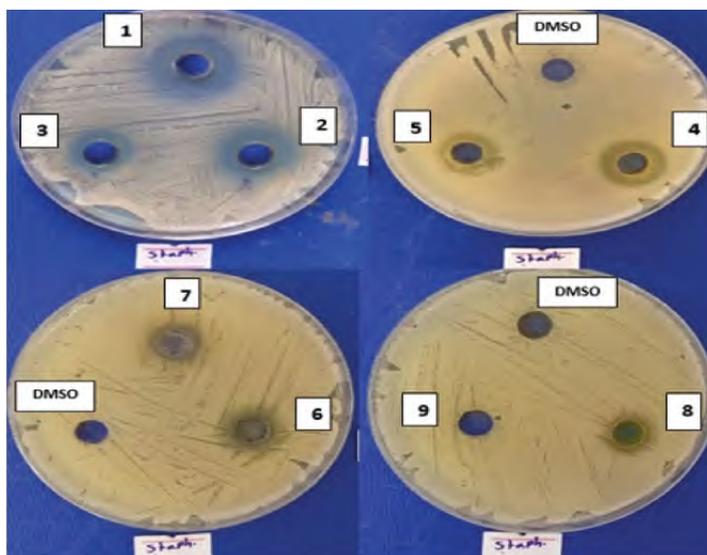
Analysis using UV-Vis spectroscopy revealed the presence of two distinct peaks of maximum absorption in the studied isolate, at 300 nm and 540 nm, as depicted in Figure 3. The first peak, at 300 nm, suggests the potential for an n-to- $\pi^*$  electronic transition, while the second peak, at 540 nm, might indicate the presence of a  $\pi$ -to- $\pi^*$  transition. Such transitions are commonly observed in unsaturated molecules containing heteroatoms double bonds like nitrogen (C=N) and oxygen (C=O).

### Antibacterial Activity

Results of antibacterial activity for alkaloid extract of Terminalia chebula Retz. fruits reveal in Table 3 and Figures 4 and 5. The results showed that the alkaloid extract has high effectiveness in inhibiting the growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria, and the diameters of inhibition against the Staphylococcus aureus isolate were greater than that of the Escherichia coli isolate this difference in activity may be possibly because of lipopolysaccharide nature of Gram-negative bacteria. The results also showed a decrease in the diameter of the inhibition zone with decreasing concentration of the alkaloid extract. The highest diameter of inhibition was recorded against the positive isolate (32 mm) at concentration 250 g/l, while the lowest diameter of inhibition for the same isolate appeared (11 mm) at concentration 2 g/l. The results also showed that the highest diameter (26 mm) of inhibition of the alkaloid extract against the Gram-negative isolate was recorded at concentration of 250 g/l, and the lowest diameter of inhibition (11 mm) was recorded for the extract at concentration 4 g/l. Therefore, concentration 2 g/l

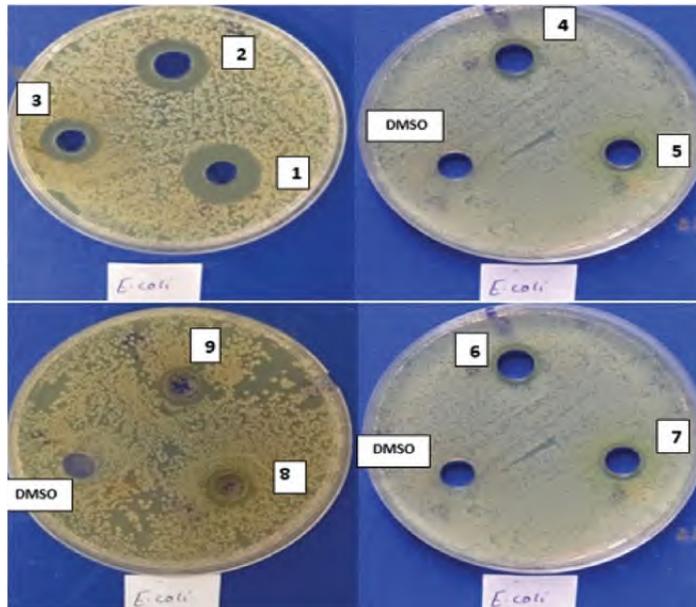
**Table 3**  
**The antibacterial efficacy of the alkaloid extract derived from Terminalia chebula Retz. fruits against Escherichia coli and Staphylococcus aureus**

Sample	Conc. of alkaloid extract	Inhibition Zone (mm)	
		S. aureus	E. coli
1	250 g/l	32	26
2	125 g/l	29	22
3	62 g/l	24	19
4	32 g/l	23	14
5	16 g/l	18	12
6	8 g/l	15	11
7	4 g/l	13	11
8	2 g/l	11	–
9	1 g/l	–	–



**Fig. 4. Inhibition Zone of the Alkaloid extract Against Staphylococcus Aureus at different concentration and DMSO**

Note: the numbering shown in the figure corresponds to the concentration values presented in Table 3.

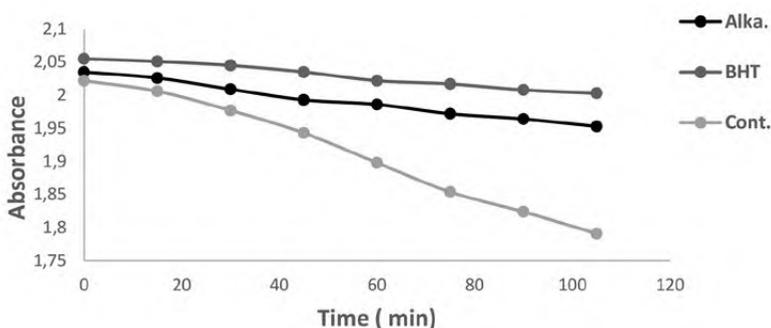


**Fig. 5. Inhibition Zone of the Alkaloid extract Against Escherichia coli at different concentration and DMSO**

Note: the numbering shown in the figure corresponds to the concentration values presented in Table 3.

**Table 4**  
**Antioxidant activity of alkaloid extract of Terminalia chebula Retz. fruits compared with BHT**

Sample	Ai	At	Ai*	At*	% AA
Alka	2.035	1.953	2.022	1.791	64.5
BHT	2.055	2.003	2.022	1.791	77.5



**Fig. 6. Antioxidant activity of fruits alkaloid extract Terminalia chebula Retz.**

is considered the minimum inhibitory concentration of the alkaloid extract against the positive isolate, while concentration 4 g/l against the negative isolate. Figures 4 and 5 also showed that the solvent DMSO did not show any effectiveness in inhibiting the growth of positive and negative bacteria used in the study.

### Antioxidant Activity

Antioxidant activity of alkaloid extract of fruits Terminalia chebula Retz. was determined by analyzing the relationship between absorbance and time (as presented in Table 4 and Figure 6) and comparing it to BHT. The percent of antioxidant activity was estimated by using mathematical Equation 1. The results showed that the alkaloid extract exhibited an antioxidant activity of 64.5%, while BHT displayed a higher activity of 77.5%.

### Anticancer Activity

In the current study, the anti-cancer activity of alkaloid extract has been investigated as a cytotoxic drug against breast cancer cell line (MCF-7) by MTT assay. The results in this work, indicated that the alkaloid extract exhibited anti-breast cancer activities at (1 g/l) concentrations, and the percent inhibition of MCF-7 cells cancerous equal (37.63%).

## DISCUSSION

Chemicals compounds in plant are classified into various class depend on the chemical structure of their putative active ingredients. These natural compounds included phenols, tannins, glycosides, alkaloids, terpenoids, steroids and phytoalexins. Alkaloids are found mostly in plants, are a kind of nitrogen compounds containing chemical molecule with a low molecular weight. Over 27,000 alkaloids have been identified, with a staggering



21,000 originating from plants [21]. Many studies have indicated that the extracts prepared for *Terminalia chebula* Retz. fruits contain alkaloids by using different solvents and different parts of plant for extraction [22–24].

Naturally occurring compounds offer promising avenues for combating the increasing threat of drug-resistant bacteria. Their effectiveness in overcoming multidrug and extensively drug-resistant phenotypes is well-documented [25, 26]. Among these natural treasures are alkaloids, a diverse group of organic nitrogen-based molecules boasting potent biological activities. They play a crucial role in the efficacy of many traditional Chinese herbal medicines. Chemically, alkaloids fall into various categories, including isoquinolines, pyrroles, pyridines, quinolines, and indoles, with over ten additional types identified [27]. The past few years have witnessed a surge in research delving into the antibacterial capabilities of alkaloids. This renewed interest stems from their diverse array of mechanisms of action, intricately linked to their unique chemical structures. Alkaloids can wield their anti-bacterial power in numerous ways, from disrupting nucleic acid and protein synthesis to altering cell membrane permeability and integrity. They can even curb bacterial metabolism and block efflux pumps, hindering their ability to expel harmful compounds. Nature's chemical library might hold the key to combating some of the toughest bacterial foes, including the notorious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). This multi-drug resistant pathogen plagues hospitals and communities, causing a myriad of infections. Research points towards natural alkaloids as promising weapons in this battle, with their diverse structures and potent antibacterial activity offering a much-needed advantage [28].

Various extracts derived from *Terminalia chebula* demonstrate antibacterial activity against several bacterial species [29]. Two compounds, namely gallic acid and ethyl ester, isolated from the ethyl alcohol extract of *Terminalia chebula* fruits, exhibit antibacterial effects against methicillin-resistant *Staphylococcus* [30]. *Terminalia chebula* proves to be effective against *Helicobacter pylori*, a bacterium implicated in gastritis, ulcers, and stomach cancers. The ether, alcoholic, and aqueous extracts of *Terminalia chebula* were tested against *Helicobacter pylori*, and the aqueous extract of the plant, at a concentration of 1–2.5 g/l, hindered the urease activity of *H. pylori* [31]. Numerous biologically active constituents were extracted from the butanol fraction of the fruit extract of *Terminalia chebula* and evaluated against six intestinal bacteria, including *Escherichia coli* [32]. The ethanolic extract derived from *Terminalia chebula* fruit demonstrated efficacy against both gram-positive and gram-negative bacteria, including *Salmonella typhi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*, indicating its broad-spectrum antimicrobial activity [33].

The significance of free radicals produced through peroxidation has grown due to their role in various pathological conditions, including atherosclerosis, ischemia, liver disorders, and neural disorders [34]. Alongside other oxygen derivatives, these radicals are unavoidable byproducts of biological redox reactions. Reactive oxygen species (ROS) like superoxide anions ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radicals ( $OH^{\cdot}$ ), and nitric oxide (NO) lead to enzyme and cellular component inactivation, causing harm through covalent binding and lipid peroxidation [35]. Antioxidant substances can serve as agents that scavenge free radicals, form complexes with pro-oxidant metals, act as reducing agents, and quench the formation of singlet oxygen. Synthetic antioxidants like butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) have limited application in foods due to concerns

about their potential carcinogenic properties [36]. Therefore, the importance of search for natural antioxidants has greatly increased in the recent years and researchers focus on natural antioxidants [37].

For millennia, humans have harnessed the potential of natural products, utilizing them in various capacities such as foods, medications, antioxidants, flavors, fragrances, dyes, insecticides, and pheromones. This utilization has not only improved our health but has also played a crucial role in enhancing crop production, unveiling intricate ecological interactions, and shaping our overall way of life [38]. Plants, in particular, house a diverse array of active chemicals, many of which possess significant medical applications, including antiviral, anticancer, analgesic, and antitubercular properties [39]. Among the extensive range of secondary metabolites, alkaloids stand out as one of the largest groups, showcasing remarkable diversity in terms of structure and biosynthetic pathways. Alkaloids, recognized for their varied, potent, and therapeutically significant properties, derive their name from "alkaline", denoting nitrogen-containing bases. These compounds, with heterocyclic ring structures and biosynthetic precursors like Indole, Purine, Quinoline, Iso-quinoline, Tropane, etc., are categorized based on their distinctive characteristics [38, 40].

Alkaloids are recognized for their diverse pharmacological effects and are notably acknowledged for their antioxidant properties. The mechanism of action underlying the antioxidant activity of alkaloids lies in their capacity to neutralize reactive oxygen species (ROS) or impede the processes that generate these harmful molecules. Alkaloids typically operate by providing electrons or hydrogen atoms to ROS, thereby stabilizing them and diminishing their reactivity. This antioxidant function serves to shield cells and tissues from oxidative stress, a condition associated with various health issues [41]. Furthermore, alkaloids may demonstrate metal-chelating capabilities, curbing the catalytic activity of metal ions involved in ROS formation [42]. In summary, the antioxidant mechanism exhibited by alkaloids contributes to their potential health benefits and protective effects against oxidative damage, as evidenced by studies evaluating the antioxidant activity of diverse alkaloid compounds using various methods [43–46].

Natural products play a crucial role as valuable reservoirs of novel drugs, potential leads, and new chemical compounds. The focus of investigating drugs derived from plants primarily revolves around the creation of diverse anticancer agents, with a particular emphasis on alkaloids. Alkaloids, predominantly located in plants, are especially abundant in specific families of flowering plants [47]. Alkaloids represent significant chemical compounds that act as a valuable reservoir for uncovering new drugs. Many alkaloids, derived from natural sources, demonstrate anti-proliferative and anti-metastatic properties against a range of cancers, both in vivo and in vitro [48, 49]. These alkaloids show promise as anticancer agents by inhibiting the enzyme topoisomerase, crucial for DNA replication, inducing apoptosis, and influencing various intracellular targets and signaling pathways [47]. Several pyrrole alkaloids displayed promising anti-cancer characteristics by triggering apoptosis, necrosis, and autophagy. The initiation of autophagy was linked to changes in Beclin-1 expression and an enhanced formation of LC3B. The induction of necrosis resulted in mitochondrial dysfunction, ultimately causing cell death upon exposure to different pyrrole alkaloids [50]. Terminalia chebula has been widely employed in Ayurveda, Unani, and homeopathic systems of medicine [51]. Fluorescence analysis studies indicated that lower concentrations of Terminalia chebula extract may trigger apoptosis [52], whereas higher doses result in necrosis, ultimately causing cell death [53].

## ■ CONCLUSION

The alkaloid extract isolated from *Terminalia chebula* Retz. fruits has antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. The study concluded presence of one alkaloid compound in the extract by using thin layer chromatography. The extract showed higher antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*) compared to Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*). The minimum inhibitory concentration was 2 g/l for *S. aureus* and 4 g/l for *E. coli*. The antioxidant activity of the extract was 64.5%. The extract exhibited anticancer activity against breast cancer cell line (MCF-7) with a percent inhibition of 37.63% at a concentration of 1 g/l.

## ■ REFERENCES

1. Hamid H.A., Ramli A.N.M., Yusoff M.M. Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: A mini review. *Front. Pharmacol.*, 2017;8:96.
2. Goel P., Alam O., Naim M.J., et al. Recent advancement of piperidine moiety in treatment of cancer-A review. *Eur. J. Med. Chem.*, 2018;157:480–502.
3. Hulcová D. et al. Amarylidiaceae alkaloids as potential glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. *Molecules*, 2018;23(4):719.
4. Zhang Y. et al. Different structures of berberine and five other protoberberine alkaloids that affect P-glycoprotein-mediated efflux capacity. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2019;40(1):133–142.
5. Kim M.-S., Lee D.Y., Sung S.H., Jeon W.K. Anti-cholinesterase activities of hydrolysable tannins and polyhydroxytriterpenoid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. fruit. *Fruit Rec Nat Prod*, 2018;12(3):284–289.
6. Nigam M. et al. Fruits of *Terminalia chebula* Retz.: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Phyther. Res.*, 2020;34(10):2518–2533.
7. Afshari A.R., Sadeghnia H.R., Mollazadeh H. A review on potential mechanisms of *Terminalia chebula* in Alzheimer's disease. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 2016;2016.
8. Revathi M., Senthilkumar G., Panneerselvam A., et al. In Vitro Assessment of *Terminalia chebula* Retz. Fruits Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharma Sci. Res.*, 2016;7(11):465–470.
9. Khan M.R.U.Z., Yanase E., Trivedi V. Extraction, phytochemical characterization and anti-cancer mechanism of Haritaki churna: An ayurvedic formulation. *PLoS One*. 2023;18(5):e0286274.
10. Dodke P.C., Pansare T.A. Ayurvedic and modern aspect of *Terminalia chebula* Retz. Haritaki an overview. *Int. J. Ayurvedic Herb. Med.* 2017;7(2):2508–2517.
11. Gupta P.C. Biological and pharmacological properties of *Terminalia chebula* Retz. (Haritaki)-An overview. *Int J pharm pharm Sci*, 2012;4(3):62–68.
12. Harborne A.J. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media, 1998.
13. Khandelwal K. *Practical pharmacognosy*. Pragati Books Pvt. Ltd., 2008.
14. Abdel-Rahman L.H., Abu-Dief A.M., Hassan Abdel-Mawgoud A.A. Development, structural investigation, DNA binding, antimicrobial screening and anticancer activities of two novel quari-dentate VO(II) and Mn (II) mononuclear complexes. *J. King Saud Univ. – Sci.*, 2019;31(1):52–60. doi: 10.1016/j.jksus.2017.05.011
15. Al-Salami B.K., Hameed A.J., Al-Rubaie A.Z. Synthesis, antimicrobial, antioxidant and structural studies of some new sulfa drug containing an azo-azomethine group. *Egypt. J. Chem.*, 2021;64(2). doi: 10.21608/EJCHEM.2020.43195.2872
16. Al-Atbi H.S., Jaraf H.A., Sabti A.B. Synthesis, Antibacterial, and Antioxidant Activities of Some Schiff Bases. *Trop. J. Nat. Prod. Res.*, 2022;6(12):2022.
17. Zearah S.A. Assessment of the Antioxidant Potential of Anthocyanin-Rich Extract of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Evaluation of its Antimicrobial Activity. *Trop J Nat Prod Res*, 2024;8(3):article in press.
18. Al-Shammari A.M. et al. Establishment and characterization of a receptor-negative, hormone-nonresponsive breast cancer cell line from an Iraqi patient. *Breast Cancer Targets Ther.*, 2015;223–230 p.
19. Al-Shammari A.M. et al. In vitro synergistic enhancement of Newcastle Disease Virus to 5-fluorouracil cytotoxicity against tumor cells. *Biomedicines*, 2016;4(1):3.
20. Freshney R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons, 2015.
21. Sirin S., Dolanbay S.N., Aslim B. Role of plant derived alkaloids as antioxidant agents for neurodegenerative diseases. *Heal. Sci. Rev.*, 2023;6:100071.
22. Baliah N.T., Astalakshmi A. *Phytochemical screening and antibacterial activity of extract of solanum trilobatum* L. 2014.
23. Vemuri P.K., Dronavalli L., Nayakudugari P., et al. Phytochemical analysis and biochemical characterization of *Terminalia chebula* extracts for its medicinal use. *Biomed. Pharmacol. J.*, 2019;12(3):1525–1529.
24. Singh G., Kumar P. Evaluation of antimicrobial activity of alkaloids of *Terminalia chebula* Retz. against some multidrugresistant microorganisms. *Int. J. Green Pharm.*, 2012;6(1).
25. Bate P.N.N., Orock A.E., Nyongbela K.D., et al. In vitro activity against multi-drug resistant bacteria and cytotoxicity of lichens collected from Mount Cameroon. *J. King Saud Univ.*, 2020;32(1):614–619.
26. Moloney M.G. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2016;37(8):689–701.
27. Luo Y.M. *Natural Medicinal Chemistry*. Wuhan, China: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
28. Yan Y., Li X., Zhang C., et al. Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. *Antibiotics*, 2021;10(3):318.
29. Ahmad I., Mehmood Z., Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J. Ethnopharmacol.*, 1998;62(2):183–193.
30. Sato Y. et al. Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.*, 1997;20(4):401–404.

## Estimation Anticancer, Antioxidant and Antibacterial Effect of Alkaloid Extract Isolated From Terminalia Chebula Retz. Fruits

---

31. Malekzadeh F., Ehsanifar H., Shahamat M., et al. Antibacterial activity of black myrobalan (*Terminalia chebula* Retz.) against *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2001;18(1):85–88.
32. Kim H.G., Cho J.-H., Jeong E. Y. et al. Growth-inhibiting activity of active component isolated from *Terminalia chebula* fruits against intestinal bacteria. *J. Food Prot.*, 2006;69(9):2205–2209.
33. Kannan P., Ramadevi S.R., Hopper W. Antibacterial activity of *Terminalia chebula* fruit extract. *African J. Microbiol. Res.*, 2009;3(4):180–184.
34. Elias J., Rajesh M.G., Anish N.P., et al. In vitro antioxidant activity of the methanolic extract of *Simaruba glauca* DC. *Asian J. Res. Chem.*, 2010;3(2): 312–315.
35. Baskar R., Rajeswari V., Kumar T.S. *In vitro antioxidant studies in leaves of Annona species*. 2007.
36. Basniwal P.K. et al. In-vitro antioxidant activity of hot aqueous extract of *Helicteres isora* Linn. fruits. 2009.
37. Elias J. In vitro Antioxidant Activity of the Methanolic Extract of *Solanum melongena* var. *insanum* Linn. *Proceedings of the 22nd Kerala Science Congress*, 2010, pp. 814–815.
38. Matsuura H.N., Fett-Neto A.G. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant toxins*, 2015;2(7):1–15.
39. Rupani R., Chavez A. Medicinal plants with traditional use: Ethnobotany in the Indian subcontinent. *Clin. Dermatol.*, 2018;36(3):306–309.
40. Roy A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *IJPB*, 2017;3(2):1–9.
41. Hieda Y. et al. Antioxidant effects of the highly-substituted carbazole alkaloids and their related carbazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014;24(15):3530–3533.
42. Liu C.-M. et al. Antioxidant and anticancer aporphine alkaloids from the leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena*. *Molecules*, 2014;19(11):17829–17838.
43. Gurung P., De P. Spectrum of biological properties of cinchona alkaloids: A brief review. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2017;6(4):162–166.
44. Ng R.C., Kassim N.K., Yeap Y.S., et al. Isolation of carbazole alkaloids and coumarins from *Aegle marmelos* and *Murraya koenigii* and their antioxidant properties. *Sains Malaysiana*, 2018;47(8):1749–1756.
45. Othman W.N.N.W. et al. Alkaloids from *Cryptocarya densiflora* Blume (Lauraceae) and their cholinesterase inhibitory activity. *Phytochem. Lett.*, 2017;21:230–236.
46. Fahmy S.A., Issa M.Y., Saleh B.M., et al. *Peganum harmala* alkaloids self-assembled supramolecular nanocapsules with enhanced antioxidant and cytotoxic activities. *ACS omega*, 2021;6(18):11954–11963.
47. Mondal A., Gandhi A., Fimognari C., et al. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur. J. Pharmacol.*, 2019;858:172472.
48. Lu J.-J., Bao J.-L., Chen X.-P., et al. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2012;2012.
49. Lee M.R. The history of Ephedra (ma-huang). *JR Coll Physicians Edinb.*, 2011;41(1):78–84.
50. Bandyopadhyay D., Mukherjee S., Granados J.C., et al. Ultrasound-assisted bismuth nitrate-induced green synthesis of novel pyrrole derivatives and their biological evaluation as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012;50:209–215.
51. Vaidya A.D.B., Devasagayam T.P.A. Current status of herbal drugs in India: an overview. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2007;41(1):1–11.
52. Saleem A., Husheem M., Härkönen P., Pihlaja K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *J. Ethnopharmacol.*, 2002;81(3):327–336.
53. Sandhya T., Lathika K.M., Pandey B.N., Mishra K.P. Potential of traditional ayurvedic formulation, *Triphala*, as a novel anticancer drug. *Cancer Lett.*, 2006;231(2):206–214.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.4.009>



Al-Khafaji N.Q.<sup>1</sup>✉, Al-Khafaji B.Y.<sup>2</sup>, Al-Omar D.K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq

<sup>2</sup> College of Medicine, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq

## Evaluation of Kidney Functions and Heavy Elements Levels in the Blood Serum of Patients with Chronic Kidney Disease Prior and After Hemodialysis

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Al-Khafaji N.Q. – conceptualization, investigation, resources, data curation, writing of the article; Al-Khafaji B.Y. – conceptualization, methodology, data curation, writing of the article; Al-Omar D.K. – conceptualization, methodology, writing of the article.

The article is published in author's edition.

Submitted: 17.12.2023

Accepted: 16.09.2024

Contacts: noor49617@gmail.com

### Abstract

**Purpose.** To determine the role of certain heavy metals in forming the endogenous intoxication syndrome in chronic kidney disease and to evaluate the impact of hemodialysis procedure on cadmium, selenium, zinc, lead, as well as total calcium and inorganic phosphorus blood levels, which can aggravate the severity of endogenous intoxication syndrome in renal dysfunction.

**Materials and methods.** A total of 75 participants took part in the study: 50 patients undergoing hemodialysis (of which 70% were men, and 30% were women) and 25 practically healthy individuals represented by medical staff. The patients were divided into age groups of 17–36 years, 37–56 years and 57–76 years (age range was within 17–75 years). The majority of patients belonged to the older age group (57–76 years). Venous blood (4.0 ml) was sampled from all study population. The serum obtained by centrifugation was stored at –20 °C until testing. For heavy metals assay, 1.0 ml of blood serum was used. Their levels were quantified using atomic absorption spectrophotometer FAAS. – AA7000 Shimadzu (Japan). At the same time with heavy metals, total calcium, inorganic phosphorus, urea and creatinine in serum were determined using UV-light spectrophotometer (Apple/Japan). The statistical analysis was performed using SPSS program, version 26 (Statistical Package of Social Science), based on using One way ANOVA, LSD.

**Results.** Two main cycles of clinical and laboratory examination were performed, prior to and after hemodialysis, in each of which 50 patients were involved. At the same time, heavy metals levels were determined in practically healthy subjects constituting the control group. The mean levels (Mean±SD) of lead and cadmium (Pb and Cd) were found to be higher prior to hemodialysis procedure than after it:  $1.04\pm 0.38$  and  $0.065\pm 0.18$  mg/L and  $0.82\pm 0.25$  and  $0.054\pm 0.019$ , respectively, while conversely, the mean zinc and selenium (Zn and Se) levels of  $0.016\pm 0.008$  and  $0.178\pm 0.068$  (respectively) were lower than after treatment:  $0.026\pm 0.011$  and  $0.239\pm 0.062$  (respectively). At the same time, the levels of heavy metals cadmium and lead in patients prior to hemodialysis were

significantly higher than in the control group ( $0.050\pm 0.015$  and  $0.71\pm 0.27$ , respectively). Selenium and zinc levels in patients tested in the pre-dialysis stage were significantly lower than in the group of practically healthy subjects ( $0.934\pm 0.204$  and  $0.037\pm 0.005$ ), respectively. After hemodialysis, selenium and zinc levels increased ( $0.239\pm 0.062$  and  $0.026\pm 0.011$ , respectively), while remaining significantly lower than normal ( $0.934\pm 0.204$  and  $0.037\pm 0.005$ , respectively). Increased levels of urea, creatinine, calcium and inorganic phosphorus in pre-dialysis stage were indicators of kidney dysfunction severity degree. The data obtained allow suggesting that kidney dysfunction leads to an increase in blood levels of heavy metals Cd and Pb entering the body from environment with food, drinks, and as a result of occupational activity. Their accumulation in the body can aggravate the severity of endogenous intoxication in kidney dysfunction. Also, the mentioned decrease in levels of trace elements Se and Zn, both largely determining the activity of antioxidant enzymes (as cofactors), certainly contributes to this.

**Conclusion.** The increase in lead and cadmium blood levels and the decrease in selenium and zinc blood levels in patients with kidney dysfunction revealed in the study allowing to consider these elements as kidney dysfunction biomarkers, and the observed changes in their levels after hemodialysis could be considered as effectiveness indicators of using this kind of therapy in hospital clinics.

**Keywords:** heavy elements, kidney functions, hemodialysis, chronic kidney disease, renal failure

---

Аль-Хафаджи Н.К.<sup>1</sup>✉, Аль-Хафаджи Б.Я.<sup>2</sup>, Аль-Омар Д.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научный колледж Университета Ти-Кара, Ти-Кар, Ирак

<sup>2</sup> Медицинский колледж Университета Ти-Кара, Ти-Кар, Ирак

## Оценка функции почек и содержания тяжелых металлов в сыворотке крови пациентов с хронической болезнью почек до и после проведения гемодиализа

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Аль-Хафаджи Н.К. – концепция, исследование, ресурсы, обработка данных, написание статьи; Аль-Хафаджи Б.Я. – концепция, методология, обработка данных, написание статьи; Аль-Омар Д.К. – концепция, методология, написание статьи.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 17.12.2023

Принята: 16.09.2024

Контакты: noor49617@gmail.com

### Резюме

---

**Цель.** Установление роли отдельных тяжелых металлов в формировании синдрома эндогенной интоксикации при хронической болезни почек и оценка эффективности процедуры гемодиализа на содержание в крови кадмия, селена, цинка, свинца, а также общего кальция и неорганического фосфора, способных усугублять тяжесть проявления синдрома эндогенной интоксикации при нарушении функции почек.



**Материалы и методы.** В исследовании приняли участие 75 человек: 50 пациентов, подвергнутых процедуре гемодиализа (из них 70% мужчин, 30% женщин), и 25 практически здоровых лиц, каковыми явились медицинские работники. Контингент пациентов был распределен на возрастные группы: 17–36 лет, 37–56 лет и 57–76 лет (диапазон возраста составил 17–75 лет). Большинство пациентов относилось к старшей возрастной группе – 57–76 лет. У всех исследуемых производили взятие венозной крови (в объеме 4,0 мл). Полученную путем ее центрифугирования сыворотку хранили до проведения исследования при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для определения тяжелых металлов использовали 1,0 мл сыворотки крови. Определение их содержания осуществлено с использованием атомно-абсорбционного спектрофотометра FAAS. – AA7000 Shimadzu/Japan (Шимадзу/Япония). Параллельно с тяжелыми металлами устанавливалось содержание в сыворотке крови общего кальция, неорганического фосфора, а также мочевины и креатинина с использованием ультрафиолетового спектрофотометра UV-light spectrophotometer (Apple/Japan). Статистический анализ выполняли с применением программы SPSS, версия 26 (Statistical Package of Social Science), основанной на использовании One way ANOVA, LSD.

**Результаты.** Выполнено два основных цикла клинико-лабораторного исследования – перед и после проведения гемодиализа, в каждом из которых участвовали 50 пациентов. Наряду с этим было определено содержание тяжелых металлов в группе практически здоровых человек, составивших контрольную группу. Установлено, что до проведения процедуры гемодиализа средняя концентрация (Mean $\pm$ SD) свинца и кадмия (Pb и Cd) была выше, чем после нее:  $1,04\pm 0,38$  и  $0,065\pm 0,18$  мг/л и  $0,82\pm 0,25$  и  $0,054\pm 0,019$  соответственно, тогда как средняя концентрация цинка и селена (Zn и Se) –  $0,016\pm 0,008$  и  $0,178\pm 0,068$  соответственно, напротив, оказалась ниже, чем после лечения:  $0,026\pm 0,011$  и  $0,239\pm 0,062$  соответственно. При этом концентрация тяжелых металлов кадмия и свинца у пациентов до проведения гемодиализа оказалась значительно выше, чем у лиц контрольной группы –  $0,050\pm 0,015$  и  $0,71\pm 0,27$  соответственно. Содержание селена и цинка у пациентов, исследованных в преддиализной стадии, было существенно ниже такового в группе практически здоровых лиц –  $0,934\pm 0,204$  и  $0,037\pm 0,005$  соответственно. После проведения гемодиализа уровни селена и цинка повысились –  $0,239\pm 0,062$  и  $0,026\pm 0,011$  соответственно, оставаясь, тем не менее, значительно ниже, чем в норме ( $0,934\pm 0,204$  и  $0,037\pm 0,005$  соответственно). Показателем степени выраженности нарушения функции почек явилось отмеченное в преддиализной стадии возрастание концентрации мочевины, креатинина, кальция и неорганического фосфора. На основании полученных данных представляется возможным судить о том, что нарушение функции почек вызывает увеличение содержания в крови тяжелых металлов Cd и Pb, поступающих в организм из окружающей среды с пищей, напитками, а также в результате профессиональной деятельности. Их накопление в организме способно усугубить выраженность эндогенной интоксикации при нарушении функции почек. Этому не может не способствовать отмеченное снижение содержания микроэлементов Se и Zn, во многом определяющих активность антиоксидантных ферментов (в качестве кофакторов).

**Заключение.** Установленные в ходе исследования пациентов с нарушением функции почек увеличение содержания в крови свинца и кадмия и уменьшение селена и цинка позволяют рассматривать эти элементы как биомаркеры нарушения функции почек, а отмеченную после проведения гемодиализа динамику изменения

их содержания – как показатель эффективности использования этого вида лечения в госпитальной клинике.

**Ключевые слова:** тяжелые элементы, функции почек, гемодиализ, хроническая болезнь почек, почечная недостаточность

---

## ■ INTRODUCTION

Environmental pollutants such as heavy elements (HEs), air pollutants, agricultural chemicals, contaminated drinking water and food is a major cause of disease, disability, and death worldwide [1], particularly as the global environment continues to worsen, HEs are chemical elements that have a specific gravity at least five times more than water [2]. The HEs such as lead, nickel and cadmium have a serious effect on human health as a result of their distribution into the environment and their ability to accumulate inside the human body, so these elements become poisonous and harmful when they are higher than the normal levels. Their poisoning results from the interaction of the elements with biological electron-donor groups and with essential cations, particularly calcium, iron, and zinc [2] or with anions [i.e., carbonate, hydroxide and oxalate] negatively charged moieties on macromolecules such as proteins [3, 4]. It can absorb up to 50% of the heavy inorganic minerals inhaled in the lungs [5]. HEs linked to red blood cells, and are eliminated mainly slowly by the urine but some of them like lead accumulated in the skeleton, and are released only slowly from this body compartment [6]. When not digested the HEs accumulate in the human body and become very toxic and cause many problems to human health, including damage to nerves, blood composition and many organs such as liver, lungs and kidneys [7], the HEs exposure is also known to be a cause acute and chronic kidney disease (CKD) [7]. The effects of elements have been extensively studied on human health and regularly reviewed by international organizations such as the WHO [8].

CKD is an important cause of morbidity and mortality all over the world. CKD also called chronic kidney failure, chronic renal insufficiency or uremia is a slowly progressive loss of renal function over a period of months or year and is defined as an abnormally low glomerular filtration rate (GFR) [9]. CKD that leads to severe illness which requires renal replacement therapy such as dialysis is called end-stage renal disease [10], the CKD is an irreversible and eventually leads to total kidney failure [11].

Dialysis is a procedure that removes excess fluids and toxic end products of metabolism such as urea from the plasma and corrects electrolytes balance by dialyzing the patient's blood against fluid containing no urea but has levels of minerals like potassium and calcium that are similar to their natural concentration in healthy blood [12]. The initiation of dialysis intensely affects quality of life, incurs significant financial costs, and mandates the use of expensive dialysis resources, other risks include accelerating the loss of residual renal function and dialysis-related morbidities. The negative consequences of initiating dialysis can be especially deleterious in the elderly, who are very sensitive to lifestyle changes and suffer the highest overall complication rates [13].

In medicine, dialysis is used to provide an artificial replacement for lost kidney function due to renal failure. It is a life support treatment and does not treat any kidney diseases [11],



so essential kidney functions such as the elimination of water and metabolic wastes as well as the correction of the electrolyte and acid/base state, are replaced by the artificial purification system. Elements such as Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> must be kept in a rather narrow physiological range; otherwise, life-threatening events may occur [14,15]. The kidney is characterized by its ability to compensate for renal damage, and for this reason, classical tests are insensitive, as they only deviate late, when a large part of the nephron mass is already lost [16]. Hence, tools for detecting HEs nephrotoxicity must be sensitive enough to detect early events [17]. There is no any study related with this subject had been done in Thi-Qar province.

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To determine the role of certain heavy metals in forming the endogenous intoxication syndrome in chronic kidney disease and to evaluate the impact of hemodialysis procedure on cadmium, selenium, zinc, lead, as well as total calcium and inorganic phosphorus blood levels, which can aggravate the severity of endogenous intoxication syndrome in renal dysfunction.

## ■ MATERIALS AND METHODS

### **Data of Samples**

This study involved 100 sample of patients with chronic renal failure [Pre and post hemodialysis] males and females, with an age ranging from 17–76 years, which they were present at the hemodialysis units in the Al-Hussain hospital, the period of study was from Sept 2022–2023, all the patients were undergo to the hemodialysis since 1–15 years. Twenty-five healthy people [males and females] were chosen as a control group. The blood samples were collected during the study period from patients on hospital undergo to hemodialysis and healthy persons. The personal information was obtained from each participant (patient and healthy) through the special questionnaire containing the following items; age, sex, occupational data, history of smoking, chronic disease and duration of renal failure?

### **Exclusion Criteria**

Patients suffering from any disease other than CKD that could affect their hematological parameters such as malignancy, inherited or acquired blood diseases, acute or chronic inflammation, connective tissues diseases, or recent hemorrhagic episode, Pregnant and lactating women and Patients with hepatitis B all the mentioned cases were excluded from the study.

### **The Collection of Blood Samples**

Blood samples (4 ml) were taken from CKD patients pre hemodialysis and post hemodialysis sessions, patients with hepatitis B were excluded from this study. About (4 ml) of blood sample was putted in a test tube and after that, it was separated to obtain blood serum, it was divided into two parts for the purpose of estimating kidney functions and HEs and then all tubes were transferred in an ice box until they arrived to the lab. The separated serum was kept in the refrigerator at a temperature of –20 °C, and then the required analyzes are carried out on the preserved serum.

### Preparation and Digestion of Serum

About 4 ml of blood samples were centrifuged (6000 rpm/min) for 15 min. to get the serum which was kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The digestion of serum was done according to Ji & Ren (2002) which included adding 2 ml of Nitric acid (70%) and 1 ml of Perochloric acid (70%) to 1 ml of serum in a Pyrex tube and then heating of this compound with a water path on a hot plate at  $160^{\circ}\text{C}$  for one hour, then cooled and finally completed to 10 ml with (30%) Hydrochloric acid, acid-washed plastic (polypropylene) vessels were used for saving and storing serum samples.

### Apparatuses

Flame Atomic Absorption Spectrophotometer (FAAS. – AA7000 Shimadzu/Japan) was used to estimation of Pb, Cd, Zn and Se elements in the blood serum, and this was done according to the manufacturer's procedure. Kidney function was measured by following Jaffe's method was used to analyze serum creatinine using standards and reagents and by using a UV-light spectrophotometer (Apple/Japan).

### Statistical Analysis

The data of this study were statistically analyzed by using SPSS version 26 (Statistical Package of Social Science), based on using One way ANOVA, LSD, independent sample t test, paired t test and comparison of the kidney functions and toxic elemental in renal failure patients pre and post hemodialysis and with controls. The statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the results of the TEs in the biological samples of normal subjects [blood serum] and CKDPs of two categories, pre and post hemodialysis. The p value less than 0.05 was considered to be significant.

## RESULTS

The result in table 1 shows the distribution of patients with CKD according to gender.

The present study showed that the high incidence of kidney failure was in the third age group 57–76 year with 24 patients, while the incidence decreased in the age group 17–36 year with 7 patients as table 2.

**Table 1**  
Distribution according to the gender

Sex	No.	%
Males	35	70
Females	15	30
Total	50	100

**Table 2**  
Distribution according to the age

Age/year	No.	%
17–36	7	14
37–56	19	38
57–76	24	48
Total	50	100

**Table 3**  
**HEs in the study samples**

Heavy Elements	Pre hemodialysis No. 50	Post hemodialysis No. 50	Control No. 25	p. value & LSD
	Mean±SD (mg/L)			
Se	0.178±0.068	0.239±0.062	0.934±0.204	<0.001 (0.04, 0.05)
Cd	0.065±0.018	0.054±0.019	0.050±0.015	0.002 (0.006, 0.008)
Zn	0.016±0.008	0.026±0.011	0.037±0.005	<0.001 (0.034, 0.042)
Pb	1.04±0.38	0.82±0.25	0.71±0.27	<0.001 (0.12, 0.15)

The results showed (Table 3) that Pb and Cd recorded the high mean concentration 1.04±0.38 and 0.065±0.018 mg/L respectively in the patients' blood serum pre HD with significant differences compared with post HD and control group, the values of LSD were 0.12, 0.15 for Pb and 0.006, 0.008 for Cd, while the lower mean concentration in the patient's pre HD was recorded of Zn and Se 0.016±0.008 and 0.178±0.068 mg/L respectively with significant differences compared with post HD and control group. The values of LSD were 0.034, 0.042 for Zn and 0.04, 0.05.

The mean concentration of the HEs Pb and Cd pre-HD were higher than that in the post HD with the mean of differences 0.33707 and 0.01056 for Pb and Cd respectively, while the mean concentration of Zn and Se pre-HD were lower than that in the post HD with the mean of differences -0.00967 and -0.06112 for Zn and Se respectively, as shown in Table 4.

The kidney functions (KFs) in the current study showed an increase in the mean concentration of (urea, creatinine and Pi) in patients pre HD with significant differences compared to post HD and control group, the value of LSD were 6.7, 8.3, 0.32, 0.40 and 0.56, 0.69 for urea, creatinine and phosphorous respectively, while the mean concentration

**Table 4**  
**HEs concentration pre and post hemodialysis**

Heavy elements	Pre hemodialysis	Post hemodialysis	Mean of differences	p. value
	Mean±SD (mg/l)			
Se	0.178±0.068	0.239±0.062	-0.06112	<0.001
Cd	0.065±0.018	0.054±0.019	0.01056	0.008
Zn	0.016±0.008	0.026±0.011	-0.00967	<0.001
Pb	1.04±0.38	0.71±0.27	0.33707	<0.001

**Table 5**  
**KFs in the study samples**

Kidney functions	Pre hemodialysis No. 50	Post hemodialysis No. 50	Control No. 25	p. value & LSD
	Mean±SD			
B. urea (mg/dl)	149.6±18.2	78.6±19.4	32.3±5.76	<0.001 (6.7, 8.3)
S. creatinine (mg/dl)	3.25±0.98	2.19±0.83	0.86±0.26	<0.001 (0.32, 0.40)
Ca (mmol/L)	1.87±0.31	1.62±0.22	2.23±0.18	<0.001 (0.10, 0.12)
Pi (mg/dl)	5.68±1.64	4.17±1.43	3.73±0.85	<0.001 (0.56, 0.69)

**Table 6**  
**KFs concentration pre and post hemodialysis**

Kidney functions	Pre hemodialysis	Post hemodialysis	Mean differences	p. value
	Mean±SD			
B. urea (mg/dl)	149.6±18.2	78.6±19.4	71.000	<0.001
S. creatinine (mg/dl)	3.25±0.98	2.19±0.83	1.0653	<0.001
Ca (mmol/L)	1.87±0.31	1.62±0.22	0.2502	<0.001
Pi (mg/dl)	5.68±1.64	4.17±1.43	1.5148	<0.001

of Ca decreased in patients post HD with significant differences compared to pre HD and control group, the value of LSD was 0.10, 0.12. As in the Table 5.

The results in Table 6 showed that the mean concentration of B. urea and creatinine pre-HD were higher than that in post HD with mean differences were 71.000 and 1.0653 for B. urea and creatinine respectively, while the mean concentration of Ca and Pi were higher than that in post HD with mean differences were 0.2502 and 1.5148 for Ca and Pi respectively.

## ■ DISCUSSION

The percentage observed that the males group were forming 70% higher than the females which recorded 30%, this may be due to that the males were exposure to the factors lead to incidence by kidney failure more than the females (occupations), statistical analysis showed significant differences between these percentage. The result was compatible with [18], also in accordance with the forging study [19] which recorded that the annual incidence by CKD was twice as high in males than the females.

This study was compatible with the local study [18], while was disagree with forging study [19], which observed that the peak of incidence was older than 75 year. The density of incidence in advanced age in the present study maybe due to the diseases of diabetes mellitus or hypertension or both of them, because most Iraqi people sever from the mentioned deceases especially in advance age and these diseases are common cause of kidney failure, in addition to that the patients have either poor compliance to the drug or under controlled therapy, limited health servers and delay of medical consultation, also may be there were another causes for such incidence like, unhealthy diet as well as environmental, occupational pollution and smoking.

This nephrotoxicity may be caused by acute and sub-acute exposure of these HEs through nature and anthropogenic sources. The high mean concentration of Pb and Cd toxicity in our hemodialysis patients are consistent with previous research [20, 21]. As well as the results observed that the mean concentration of Zn and Se in patients pre HD were lower as compared to post HD and the control group, this consistent with a study conducted by [22], the results of these investigations showed a decrease in the mean concentration of Zn and Se pre HD as compared to post HD and the control group, while the mean concentration of the mentioned elements increased significantly post HD, the reason for this is due to the endogenous toxicities, impaired or cessation kidney function, dietary restriction and therapeutic measures (HD). Also, this decrease in the mean concentration of them may be because the trace elements Zn and Se were made as cofactors of the antioxidant enzymes and they are continuously utilized to produce the antioxidant enzymes that participate in the detoxification of the ROS [23, 24].



This may be due to the efficiency of HD units in the mentioned hospital, the patient commitment to the number of HD sessions during the week, in addition to the patient's health and psychological status pre and during HD, this agrees with a study [21] in which they referred that the level of HEs (Pb, Cd, and Al) in the blood samples of patients pre HD were higher than that in the post HD and the control group, while disagreeing with the results of a study [25] which showed that the level of (Pb and Al) in the serum of patients post HD were higher than that in pre HD, when they compare the level of elements in the blood pre and post HD significant differences were observed, this indicates that the level of the mentioned elements has increased due to HD and this also was mentioned by [26].

Biochemical markers play an important role in accurate diagnosis and also for assessing risk and adopting therapy that improves clinical outcome. National Institute of Health (NIH, 2001) defined a biomarker as "a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological, pathologic processes or pharmacologic responses to a therapeutic intervention so the markers of renal function: creatinine, urea, uric acid and electrolytes are using for the routine analysis. The results (Table 6) showed a significant increase in the mean concentration of (B. urea, creatinine and Pi) pre HD with significant differences compared to the post HD and control group. The increase of serum urea may be due to the proportional to the progression of the disease but it is highly influenced by a catabolic state or an excessive protein ingestion leading to a higher production of other waste substances of protein catabolism, while the increase in creatinine level in the serum of patients with CKD is attributed to the decrease in the functioning of nephrons which would reduce the GFR and causes a major decrease in renal excretion of water and metabolism wastes, while the increase in serum phosphorus pre HD may be due to that in the normal case of the inorganic phosphorous is filtered in the renal glomeruli (nephrons) and about 85–90% of the phosphorous filtered load was reabsorbed by active transport in the proximal tubule [27]. This active transport is powerfully inhibited by parathyroid hormone, as GFR decreased and phosphorus retention was increased which is due to decreased renal excretion and serum phosphorus levels rise [28]. Serious changes are apparent when the GFR decreased to <30 ml/min, while the decrease in the mean concentration of Ca pre HD may be due to the Intestinal calcium absorption was decreased in renal failure, because the kidney is responsible for secreting calcitriol, which play a role in plasma calcium regulation in concert with parathyroid hormone (PTH) by stimulation absorption of dietary calcium and phosphate from the gastrointestinal tract, which promotes renal tubular reabsorption of calcium in the kidneys and stimulating the release of calcium stores from the skeletal system, also partial absorption of calcium is inversely related with plasma concentration of blood urea nitrogen in addition, patients with chronic renal failure ingest less calcium in their diets and this agrees with [29, 30].

This may be due to several factors including the physiology of kidney failure, the amount of waste and toxins in the body, level of salts and body weight, in addition to the patient body's response to HD sessions, and these results consistent with the study [31] which explained that the reason of decrease in the level of kidney function post HD is due to removal by dialysis, which lead to relatively higher renal clearance values. In this case, the observed of decline rate may be an artifact and the real GFR is not necessarily affected. [32] referred that decreased levels of urea and creatinine post HD may be due to dialysis itself, during which urea and creatinine are removed from the extracellular compartment. When the generation rates of both solutes remain unaltered, their removal will lead to

decreased plasma concentrations. It can be hypothesized that the consequent reduced osmotic load by dialysis will lower the residual GFR initially, because less hyper-filtration by the remnant glomeruli will occur, It is also inconsistent with a study [33] about the levels of electrolytes [sodium, potassium, and chloride] in the blood of patients pre and post HD which showed the levels of sodium and chloride were lower post the HD process, while the potassium level was increased post the HD process.

## ■ CONCLUSIONS

The percentage of CKD patients in males was more than in females. The incidence of CKD in patients with advanced age was more than this in low ages. The existence of the HEs (Pb and Cd) in the blood serum of patients in high concentration pre-HD refers to their exposure to these elements through the environment, food and drink and occupation. The increased concentration of the kidney biomarkers in pre-HD and their decrease post HD, can be explained that the Kidney of patients were exposure to the risk of HEs and affected upon the concentration of biomarkers in the blood serum. The lower concentrations of HEs (Pb and Cd) and most kidney biomarkers (urea, creatinine and Pi) post HD due to the efficiency of hemodialysis devices in the dialysis unit of the hospital.

---

## ■ REFERENCES

1. Noora K.K., AL-khafaji B.Y. Concentration of Total petroleum Hydrocarbons and Selected Heavy Metals in Soil and Plant Nearby Al-Nassiriya Oil Refinery South of Iraq. *Journal of science*. 2019;7(1):41–46.
2. AL-Khafaji B.Y., AL-Ghizzy F.A. Concentration of cobalt in the blood serum of workers at fuel stations and its impact on some hematological parameters in Al-Nasiriyah city center of Thi-Qar province southern of Iraq. *J. Thi-Qar Sei*. 2016;5(4):1441–414.
3. Fairhurst S. Hazard and risk assessment of industrial chemicals in the occupational context in Europe. *Food Chem Toxicol*. 2003;41(11):1453–62.
4. Bachanek T., Staroslawska E., Wolanska E., Jarmolinska K. HEs poisoning in glass worker characterized by severe. *Ann AgricEnviro Med*. 2000;7(1):51–3.
5. Anetor J.I., Adelaja O., Adekunle A.O. Serum micronutrient levels, nucleic acid metabolism antioxidant defenses in pregnant Nigerians: Implications for fetal and maternal health. *Afr J Med Med Sci*. 2003;32(3):257–62.
6. Guallar E., Sanz-Gallardo M.I., Vanut Veer P., et al. HEs and Myocardial Infarction Study Group. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2002;347(22):1747–54.
7. Mortada W.I., Sobh M.A., El-Defrawy M.M., Farahat S.E. Study of lead exposure from automobile exhaust as a risk for nephrotoxicity among traffic policemen. *Am J Nephro*. 2001;21(4):274–9.
8. WHO. Arsenic and Arsenic Compounds. Environmental Health Criteria 224 Geneva: World Health Organization. 2001.
9. NKF: National Kidney Foundation. *American journal of Kidney Disease*. 2002;39 (Suppl 1):S1–S266.
10. Levey A., Eckardt K., Tsukamoto Y., et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005;67(6):2089–100. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00365.x.
11. John R., Webb M., Young A., Steven P. Unreferred chronic kidney disease: a longitudinal study. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(5):825–35. doi: 10.1053/ajkd.2003.12.046.
12. Ahmad S., Misra M., Hoenich N. and Daugirdas J. *Hemodialysis Apparatus In: Handbook of Dialysis*. 4th ed. New York, 2008; 59–78 p.
13. USRDS. Annual Data Report: Atlas of end-stage renal disease in the United States. Bethesda, Md.: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2006.
14. Richard M.J., Arnoud J., Jurkovicz C., et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron*. 1991;57:10–15.
15. Soyak M., Elçi L., Dogan M. Determination of some trace elements in dialysis solutions by atomic absorption spectrometry after preconcentration. *Anal Lett*. 1993;26:1997–2007.
16. Roels H.A., Hoet P., Lison D. Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. *Ren Fail*. 1999;21:251–262.
17. Soyak M., Uzun A., Elçi L. Sorbent extraction of copper, lead, nickel and cadmium ions in dialysis concentrates before their atomic absorption spectrometric determinations. *Trace Elem Electroly*. 2002;19:15–19.
18. Kadhum W.A. Serum lipid profile in renal failure patients, unpublished master thesis. Kufa university, 2008.
19. Deighan C.J., Caslake M.J., McConnell M., et al. Atherogenic lipoprotein phenotype in endstage renal failure: Origin and extent of small dense low density lipoprotein formation. *American Journal for Kidney Disease*, 2000;35:852–862.
20. Jarup L., Hellstrom T., Alfvén T., et al. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: The OSCAR study. *Occup Environ Med*. 2002;57:668–672.
21. Kazi T.G., Jalbani N., Kazi N., et al. Evaluation of toxic elements in blood and urine samples of chronic renal failure patients, before and after dialysis. *Renal Failure*. 2008;30(7):737–745.



22. Marcello Tonelli, Natasha Wiebe, Brenda Hemmelgarn et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*. 2009;7:25. doi: 10.1186/1741-7015-7-25
23. Reena N., Deepti P., Ashok K., et al. Trace elements and antioxidant enzymes associated with oxidative stress in the preeclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Clinical nutrition*. 2012;31(6):946–50.
24. Azize Safa W. Study of HESand their effects on Oxidant / Antioxidant Status in Workers of fuel Station in Hilla city-Iraq. *Research J. Pharm. and Tech*. 2018;11(1). ISSN 0974-3
25. Atieh Makhloogh, Mohammad Shokrzadeh, Maryam Shaliji M., Siavash Abedi. Comparative Analysis of Serum Levels of Aluminum and Lead Level in Dialysis Patients, Pre and post Dialysis. *Research in Molecular Medicine*. 2(2):45–49. DOI:10.18869/acadpub.rmm.2.2.45.
26. Devenport A., Murcutt G., Whiting S. Cross – sectional audit of blood lead levels in regular outpatient haemodialysis patients dialyzing in north London. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(5):476–81.
27. Delmez J.A., Slatopolsky E. Hyperphosphataemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *American Journal for Kidney Disease*. 1992;19:303–17.
28. Singh N.P., Rathi B.M., Panwar B. Hyperphosphataemia of Chronic Kidney Disease: Management and Emerging Trends. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. 2008;9(4).
29. Al-Rubae' I.S.H.N., Alkhayat T.H., Muftin N.Q. Free fatty acids and biochemical changes in Iraqi patients with chronic renal failure. *Baghdad science journal*. 2010;7(1).
30. Jumaah Israa A. Mohammed. A study of some biochemical parameters in blood serum of patients with chronic renal failure. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*. 2013;39(4):A.
31. Dinanda J. de Jager, Nynke Halbesma, Raymond T. Krediet, et al. Is the decline of renal function different before and after the start of dialysis? *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28:698–705. doi: 10.1093/ndt/gfs578 Advance Access publication
32. Brenner B.M., Lawler E.V., Mackenzie H.S. The hyperfiltration theory: a paradigm shifts in nephrology. *Kidney Int*, 1996;49:1774–1777.
33. Gouri A. Gulavani1, Vinod V. Wali, Vimmi Kishore. A comparative study of pre and post dialysis biochemical parameters in chronic renal failure patients. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research*, 2020;7(2):204–206.



Kamil N.B.✉, Al-Ghaban N.M.H.  
College of Dentistry, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

## Evaluation of Moringa Oleifera Leaves Extract Effect on Osseointegration: An Experimental Study

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Kamil N.B. – conceptualization, methodology, investigation, resources, data curation, writing, software; Al-Ghaban N.M.H. – supervision, conceptualization, methodology, formal analysis, investigation.

**Ethics statement:** the study was approved by the Ethics Committee of the College of Dentistry, University of Baghdad. The article is published in author's edition.

Submitted: 02.12.2023

Accepted: 04.10.2024

Contacts: nawar.bahjat@codental.uobaghdad.edu.iq

---

### Abstract

**Introduction.** The species of *Moringa oleifera*, which is endemic to parts of East Asia regions (India, Pakistan, and Bangladesh), that are sub-Himalayan, is the most frequently grown member of the Moringaceae family.

**Purpose.** Histological and immunochemical evaluation of *Moringa oleifera* leaves extract effect on osseointegration of titanium (dental) implants.

**Materials and methods.** The total laboratory animal sample consisted of 12 rabbits that were subjected to titanium implants on both right and left sides of the femur. A total of twenty-four titanium implants were used. After exposing bone structures, holes with a diameter of about 1.8 mm were made in them to insert implants treated with Moringa oil gel (0.5 ml) on the right side of the femur; untreated implants were placed on the left side to control the efficacy of Moringa oil. The procedure of active ingredient extraction from the plant leaves is described.

**Results.** The current investigation revealed a significant difference in bone marrow volume, trabecular area, osteoblast cells, and osteocyte cells between the experimental and control groups after two weeks. While under control conditions the bone remained woven, under experimental conditions with Moringa oil gel application mature bones formation was observed in six weeks. Herewith, the immunohistochemical analysis showed that there was rapid positive cell expression of osteocytes and osteoblasts, whereas it was delayed in the control conditions.

**Conclusion.** *Moringa oleifera* leaves extract enhances osseointegration, making it an excellent coating for dental implants and showing a positive expression of bone morphogenetic proteins (BMP4).

**Keywords:** osseointegration, *Moringa oleifera*, BMP4, horseradish tree, transforming growth factor

---



Камил Н.Б.✉, Аль-Габан Н.М.Х.

Стоматологический колледж Университета Багдада, Багдад, Ирак

## Оценка влияния экстракта листьев *Moringa oleifera* на процесс остеоинтеграции: экспериментальное исследование

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Камил Н.Б. – концепция, методология, проведение исследования, ресурсы, обработка данных, написание статьи, программное обеспечение; Аль-Габан Н.М.Х. – научное руководство, концепция, методология, анализ данных, проведение исследований.

**Этическое заявление:** проведение исследования одобрено этическим комитетом Стоматологического колледжа Университета Багдада.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 02.12.2023

Принята: 04.10.2024

Контакты: nawar.bahjat@codental.uobaghdad.edu.iq

### Резюме

**Введение.** Растение моринга масличная (*Moringa oleifera*), эндемичное для субгималайских регионов Восточной Азии (Индии, Пакистана, Бангладеш), является повсеместно распространенным представителем семейства Моринговых (*Moringaceae*).

**Цель.** Гистологическая и иммунохимическая оценка влияния экстракта листьев *Moringa oleifera* на остеоинтеграцию титановых (зубных) имплантатов.

**Материалы и методы.** Общая выборка лабораторных животных включала в себя 12 кроликов, которым устанавливали титановые имплантаты с правой и левой стороны бедренной кости. Было использовано двадцать четыре титановых имплантата. После оголения костных структур в них проделывали отверстия диаметром около 1,8 мм для установки имплантата, который обрабатывали гелем на основе растения моринги масличной (0,5 мл) и устанавливали с правой стороны бедренной кости; для контроля эффективности влияния моринги масличной устанавливали необработанные имплантаты с левой стороны. Описана процедура экстракции действующего вещества из листьев растения.

**Результаты.** В ходе исследования была выявлена достоверная разница в объеме костного мозга, трабекулярной поверхности, количестве остеобластных и остеоцитарных клеток между экспериментальной и контрольной группами уже через две недели после начала эксперимента. В то время как в условиях контроля кость оставалась несформированной, в условиях использования в составе геля моринги масличной в экспериментальной группе через шесть недель отмечалось формирование здоровой кости. Иммуногистохимический анализ показал, что при этом наблюдалась быстрая положительная экспрессия клеток остеоцитов и остеобластов, в то время как в контрольных условиях она была замедленной.

**Заключение.** Экстракт листьев *Moringa oleifera* стимулирует процесс остеоинтеграции, что позволяет рассматривать его в качестве высокоэффективного покрытия для зубных имплантатов. При этом наблюдается положительная экспрессия костного

морфологического протеина (Bone morphogenetic proteins – BMP4) на ранних стадиях процесса остеоинтеграции.

**Ключевые слова:** остеоинтеграция, Moringa oleifera, BMP4, моринга, остеоцит, остеобласт

---

## ■ INTRODUCTION

The species of Moringa oleifera, which is endemic to parts of India, Pakistan, and Bangladesh that are sub-Himalayan, is the most frequently grown member of the Moringaceae family. The ancient Romans, Greeks, and Egyptians used this quickly-growing tree called the horseradish tree. It is currently widely cultivated and has naturally spread throughout many tropical areas [1].

Moringa leaves have more potassium than bananas, calcium than milk, and vitamin C and iron than spinach. Compared to milk and eggs, moringa leaves have a higher protein content. Due to its high concentration of molecules comprising simple sugar and rhamnose, as well as glucosinolates and isothiocyanates, M. oleifera is utilized as an antioxidant material to treat many disorders associated with oxidative stress [2]. It is recognized as one of the most beneficial plants in the world to be used in numerous applications since its components, particularly in the leaves, comprise carotenoids, tannins, vitamins, flavonoids, and phenolic acids demonstrating substantial antibacterial and antifungal properties [3, 4].

Moringa oleifera leaf extracts had a protective effect on BMSCs when they were exposed to peroxidative damage during osteogenic differentiation using an inhibitor of phosphoinositide-3 kinase, which was used to investigate the potential cellular and molecular mechanisms underlying the protective properties of the plant [5].

Instead of a pure bone reaction, an immune-driven mechanism results in the production of new bone around the implant surface [26]. A foreign body equilibrium (FBE) reaction would be triggered by titanium in the peri-implant tissues [27]. The immune response then controls regeneration processes and the healing of tissues. During the initial phase of peri-implant tissue healing, the same processes may activate osseointegration [28]. Immediately after implantation, proteins from the blood and interstitial fluids are quickly adsorbed onto the surface of implanted materials. Although it is obvious that such cell-surface interaction is essential for cell survival, development, and differentiation, cells typically respond to an adsorbed layer rather than the surface itself [29]. It is clear that the relevance of the perfect surface is significant since one surface may have a very different impact on host proteins than another, which may in turn have a significant impact on the future tissue formation around the implant. The biological basis of osseointegration is connected to the two primary aspects of the implant-host interaction – tissue features and biomaterial characteristics [30].

Morphogenetic proteins (BMPs) activate and/or attract pluripotent cells present in the periosteum, bone marrow, bone cortex, and adjacent soft [6]. BMPs, which are TGF (transforming growth factor) protein superfamily members, are well known for playing a crucial role in mammalian organogenesis and skeleton formation, two processes that are crucial to the development of the embryo. Additionally, BMPs are crucial in the control of bone synthesis, upkeep, and repair [7].



Skeletal healing and bone-rebuilding mechanisms involve BMP-4. It has been shown to trigger osteogenic differentiation of osteoprogenitor and osteoblasts cells. Additionally, it seems to enhance bone formation, playing a crucial role in the start of bone and cartilage growth as well as fracture healing. Additionally, during the early stages of bone regeneration, it is heavily produced by growing cells, and its expression is maintained locally throughout the healing process, functioning as a stimulator of osteoblast proliferation and chemotaxis [8].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

Histological and immunochemical evaluation of *Moringa oleifera* leaves extract effect on osseointegration of titanium (dental) implants.

## ■ MATERIALS AND METHODS

Twelve rabbits were used in this study, and twenty-four titanium implants were used so each rabbit has two implants, one on the left side of the femur and another on the right side. Averaging 2.5 to 3 kg in weight, the rabbits were employed and kept in controlled environments for temperature, hydration, and food intake.

*Moringa oleifera* is extracted from moringa leaves after stiffening and grinding leaves [13]. A combination of xylazine 2% (0.4 mg/kg body weight) and ketamine hydrochloride 50 mg (40 mg/kg B.W.) was injected intramuscularly to induce general anesthesia [9], then two incisions on the femur made on each rabbit's exposed bone and made a hole about (1.8 mm in diameter) for putting an implant [10]. The implant was coated with (0.5 ml) gel of *moringa oleifera* [14] put on the right side and on the left side with putting un-treated implant. Rabbits were divided into: the first group was killed after 2 weeks from surgery and the second group was killed after 6 weeks from the surgery. After killing expose the bone and take the specimen. Each specimen was examined histologically [33] and immunohistological by using antiBMP4. Histologically we counted osteoblast cells, and osteocyte cells and measured bone marrow area and trabecular area by using an image J [11, 32]. Immunohistological we count the expression of positive cells for osteoblast, osteocyte, and bone marrow stromal cells by multiplying intensity and percentage. Following is a grade for intensity (I): 0 denotes no effect, 1 mild, 2 moderate, and 3 strong/intense. The percentage (0%) showed 0–5% positive cells, (1%) indicated equal or more than 5–20% positive cells, (2%) indicated equal or more than 20–50% positive cells, and (3%) indicated equal or more than 50–100% positive cells [12].

### **Statistical Analysis**

The SPSS 25 program was used to analyze the data. The mean, standard deviation, and P values were used. Under or equal to 0.05 were considered significant.

## ■ RESULTS

Two and 6 weeks after the operation, we found the rabbits in good health and there were no infections or side effects.

Histological Statistic results at two weeks showed that *moringa oleifera* gel recorded a higher mean value in the account of osteocyte, osteoblast cells, trabecular bone, and new bone formation than the control group. The control group recorded a higher mean value

than moringa oliefera gel in the bone marrow area. A highly significant difference was recorded in moringa oleifera gel than control groups in osteocyte cells account. There was a substantial difference between the control and moringa oleifera gel groups in osteoblast cells account, bone marrow area, and trabecular bone but in new bone formation, the non-significant difference was recorded as shown in Table 1.

At 6 weeks histological results showed moringa oleifera recorded higher mean value in osteocyte cells account, new bone formation, and trabecular area than the control group. The control group recorded a higher mean value than experimental groups in the osteoblast cells account and bone marrow area and the osteocyte cells account showed a significantly substantial difference between experimental groups and control groups. In terms of osteoblast cell count, bone marrow area, trabecular area, and new bone formation, there was a substantial difference between the experimental group and control groups as shown in Table 2.

Histological features at two weeks illustrated the formation of thread in both groups filled with osteocyte cells, osteoblast cells, and large bone marrow. A new bone matrix was observed in experimental groups (Fig. 1).

Histological features at six weeks illustrated the formation of mature bone in moringa olifera gel but still immature woven bone in the control group. Osteon was observed in the experimental group. Osteoblast cells, osteocyte cells, and osteoclast cells were also observed.

Immunohistological results at 2 weeks showing positive cell expression for osteocyte cells, osteoblast cells, and bone marrow stromal cells recorded higher mean values in moringa oliefera gel than in the control group. A highly significant difference was recorded in osteoblast cell expression, a significant difference in osteoblast cell expression, and bone marrow stromal cells between both groups table 3.

**Table 1**  
**Histological features at 2 weeks**

2 weeks	Osteocyte	P-value	Osteoblast	P-value	Bone marrow area	P-value	Trabecular area	P-value	New bone formation	P-value
M	19.22	0.00	40.95	0.01	0.42	0.05	0.51	0.04	2.89	0.06
C	8.98		21.17		0.54		0.35		2.02	

**Table 2**  
**Histological features at 6 weeks**

6 weeks	Osteocyte	P-value	Osteoblast	P-value	Bone marrow area	P-value	Trabecular area	P-value	New bone formation	P-value
M	39.83	0.00	25.90	0.01	0.29	0.02	0.79	0.03	4.75	0.03
C	22.98		34.25		0.41		0.46		3.51	

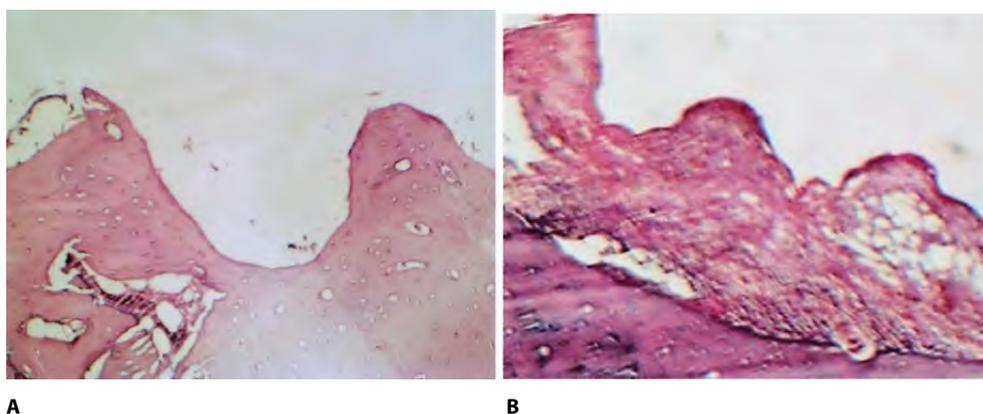


Fig 1. A – thread and new bone formation in M (H&E) ×10. B – thread formation in C (H&E) ×10 group

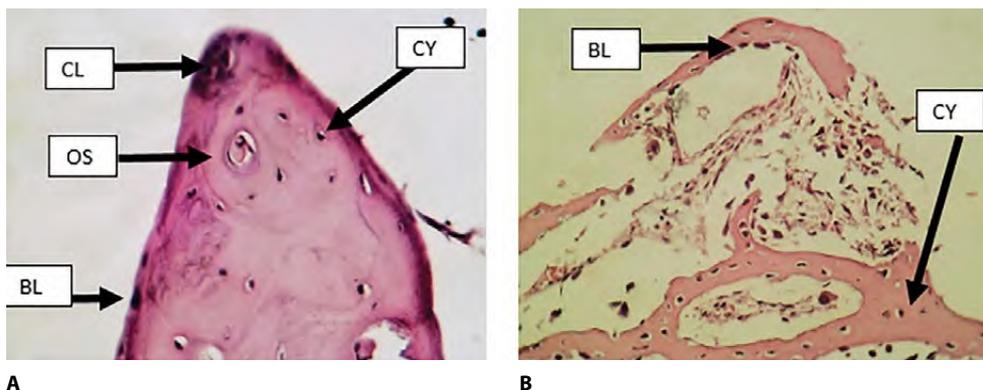


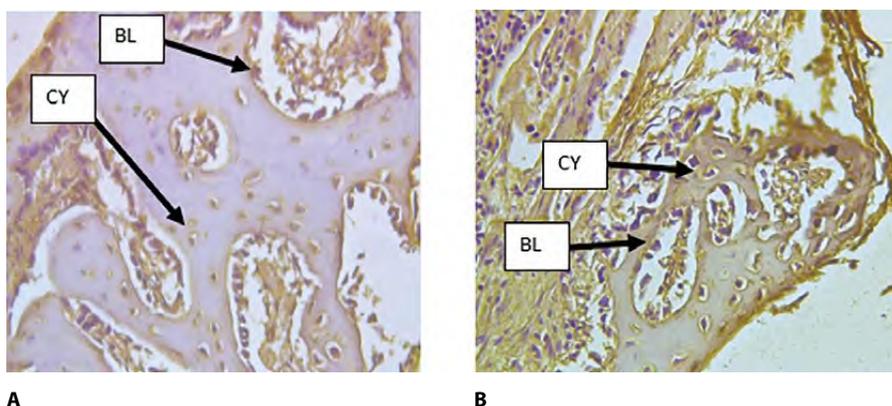
Fig. 2. A – *Moringa oleifera* group: CL – Osteoclast cells; OS – Osteon; BL – Osteoblast cell; CY – Osteocyte cell (H&E) ×20. B – Control group: BL – Osteoblast cell; CY – Osteocyte cells (H&E) ×20

Table 3  
Positive expression cells 2 weeks

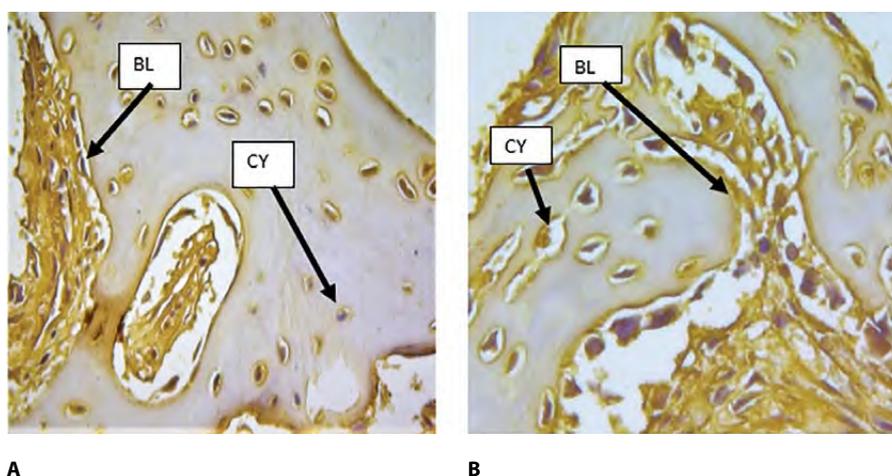
Tested groups 2 Weeks	Osteocyte cells Mean±SD	P value	Osteoblast cells Mean±SD	P value	Bone Marrow Stromal cells Mean±SD	P value
C	2.5±0.84	0.00	3.17±0.98	0.04	4.5±1.22	0.03
M	5.33±1.03		4.67±1.03		5.33±1.03	

Table 4  
Positive expression cells 6 weeks

Tested groups 6 Weeks	Osteocyte cells Mean±SD	P value	Osteoblast cells Mean±SD	P value	Bone Marrow Stromal cells Mean±SD	P value
C	2.67±0.82	0.04	4.33±0.82	0.01	4.67±1.03	0.01
M	3.67±0.52		2.33±0.52		2.83±0.75	



**Fig. 3.** IHC features at two weeks: **A** – Moringa oleifera group: **CY** – Positive expression of osteocyte cell; **BL** – Positive expression of osteoblast cell,  $\times 40$ . **B** – Control group: **CY** – Negative expression of osteocyte cell; **BL** – Negative expression of osteoblast cell,  $\times 40$



**Fig. 4.** IHC features at sixth week: **A** – Moringa oleifera group: **CY** – Negative expression of osteocyte cell; **BL** – Negative expression of osteoblast cell,  $\times 40$ . **B** – Control group: **CY** – Positive expression of osteocyte cell; **BL** – Positive expression of osteoblast cell,  $\times 40$

Immunohistological results at 6 weeks high mean value were recorded for osteoblast cells and bone marrow stromal cells in the control group than the experimental group but moringa oleifera gel recorded a higher mean value in osteocyte cells. Significant differences were recorded between both groups in all parameters in Table 4.

Immunohistological features at two weeks showed in moringa oleifera gel a large number of osteoblast, bone marrow stromal cells, and osteocyte cells with positive expression. The control group showed a high number of bone marrow stromal cells and osteoblast cells with positive expression but a large number of osteocyte cells with negative expression.



Immunohistological features at six weeks showed in moringa oleifera gel a large number of osteoblast cells and bone marrow stromal cells with negative expression but a lower percentage showing in osteocyte cells. The control group showed a high number of bone marrow stromal cells and osteoblast cells with positive expression but a lower number of osteocyte cells with positive expression.

## ■ DISCUSSION

Osseointegration is triggered by any lesion of the pre-existing bone matrix because faults result in direct bone repair. The matrix is released when growth factors and non-collagenous proteins are exposed to extracellular fluid and start the healing of bones. Exposed to extracellular fluid and start the healing of bones [24].

Moringa oleifera gel has antioxidant properties and the primary chemical component is flavonoids, which exhibit stimulating effects on osteoblast development and proliferation in addition to an inhibitory effect on osteoclasts [15] so used in this study to evaluate its effectiveness in osseointegration. Due to their high mechanical qualities, low modulus, exceptional corrosion resistance, and strong biocompatibility, titanium, and its alloys are frequently utilized for dental implants. Studies have shown that a very thin oxide cementum layer can exist between bone tissue and the titanium surface. Osseointegration is the term for this phenomenon [16]. When implants are inserted into a live bone and a suitable biological environment is created for bone growth, osseointegration can be achieved. Histologically detected osteoconductive characteristics at implant surfaces are primarily caused by a bone formation that is perpendicular to the implant [17].

After two weeks of implantation, the histological finding of the moringa oleifera gel-coated implant revealed threads following the screw shape with thick bone trabeculae, this result agreed with Satue [18], also observed osteoblast differentiation, osteocyte cells in the lacune in a large number due to Flavonoids (a component of moringa oleifera) are natural antioxidants that positively influence bone metabolism and inhibit osteoclastogenesis [15] but the histological analysis of an uncoated Ti implant reveals woven bone with the creation of a few thin bone trabeculae in the thread area this is agreed with Depprich [19]. Due to the active creation of bone during this time, osteoblast cells predominate over osteocyte cells.

Osteoblast cells account recorded a higher number in moringa oleifera gel than in control groups because the anti-inflammatory, antibacterial, antimicrobial, and immunomodulatory agents of moringa this is related to bioactive substances like alkaloids and saponins are present [25].

Bone marrow area in the experimental group was smaller than the control group and recorded a significant difference due to the anti-angiogenesis and anti-inflammatory of moringa oleifera gel [31] which stimulates differentiation of cells and secretion of the bone matrix through trigger vascular network formation which are the source of bone cells.

Histological feature after the sixth week, moringa oleifera gel illustrated Mature bone thread with osteon appearance was seen at the site of the implant, thick bone trabeculae while the control group still had immature bone with thin bone trabeculae, this is agreed with Areej [23] and is related to the fact that the moringa has high mineral deposits; calcium, phosphorus, and potassium, calcium is necessary for the growth and upkeep of

bones and teeth, preventing osteoporosis. Additionally, calcium is necessary for a healthy neurological system and blood clotting [20].

At this period, we observed an increase in the account of osteocyte cells while a decrease in the account of osteoblast cells this was because of impeding of osteoblast cells with bone matrix and formed osteocyte cells maturation of bone. Bone marrow area recorded higher value in uncoated implants than coated ones with a significant difference because of the effect of moringa in the down-regulation of tumor necrosis factor and interleukin which leads to accelerated osteoid formation and reduce bone marrow area and this is related to the anti-inflammatory effect of moringa oleifera [31].

BMP-4 monoclonal antibody showed a positive expression on osteoblasts, bone marrow stromal cells, and osteocytes this is agree with Jason et al. [21] and this is because of osteoblast differentiation and activity in bone formation at two weeks period but a moderate expression of BMP4 due to appearance of thick lamellar bone while the control groups showed negative expression of osteocyte cells because immature bone and thin trabecular bone formation.

After six weeks, due to the development of lamellar bone and bone maturation, BMP4 monoclonal antibody displayed negative expression in moringa oleifera gel. The control group exhibited positive osteoblast cell and bone marrow stromal cell expression in relation to immature bone and still-woven bone, which is consistent with the activity of bone formation [22].

The current study demonstrated that biological activity in osseointegration for moringa oleifera gel was indicated by higher BMP4 antibody expression in 2 weeks compared to 6 weeks, while in the control groups, higher BMP4 antibody expression in 6 weeks compared to 2 weeks was associated with a delay in biological activity in osseointegration.

## ■ CONCLUSION

Moringa oleifera gel enhances osseointegration, making it an excellent coating for dental implants by increasing osteoblast proliferation, accelerating bone formation, and lowering inflammation. Additionally, it shows early-phase positive BMP4 expression by early differentiating osteoblast cells.

---

## ■ REFERENCES

1. Luqman S., Srivastava S., Kumar R., et al. Experimental assessment of Moringa oleifera Leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using in vitro and in vivo assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012;519084.
2. Anwar F., Bhangar M.I. Analytical characterization of Moringa oleifera seed oil grown in temperate regions of Pakistan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(22):6558–6563.
3. Patel P., Patel N., Patel D. et al. Phytochemical analysis and antifungal activity of moringa oleifera. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014;6:144–147.
4. Kekuda T.R.P., Raghavendra H.L., Solomon T., Duresa D. Antifungal and antiradical potential of Moringa stenopetala (Baker f) Cufod (Moringaceae). *J. Biosci. Agric. Res.* 2016;11:923–929.
5. Fang Y., Chu L., Li L., et al. Tetramethylpyrazine protects bone marrow-derived mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis through PI3K/Akt and ERK1/2 pathways. *Biol Pharmaceutical Bull.* 2017;40(12):2146–52.
6. Carreira A.C., Lojudice F.H., Halcsik E., et al. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.* 2014;93:335–345.
7. Shiozaki Y., Kitajima T., Mazaki T., et al. Enhanced in vivo osteogenesis by nanocarrier-fused bone morphogenetic protein-4. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1349–1360.
8. Nakase T., Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J Bone Miner Metab.* 2006;24:425–433
9. Al-Azzawi A.S., Al-Ghaban N.M.H. Localization of Procollagen Type I N-Terminal Propeptide in Bone Healing Treated by Local Application of Moringa Oleifera / Marine Collagen in Rats. *Tikrit Journal for Dental Sciences.* 2022;10(2):167–175.
10. Mohammad M.H., Al-Ghaban N.M.H. Histological and histomorphometric studies of the effects of hyaluronic acid on osseointegration of titanium implant in rabbits. *J Bagh College Dentistry.* 2018;30(2):10–16.



11. Mohammed D.H., Alnakkash W.A.H. Biomechanical evaluation of porous titanium implants (CpTi) fabricated by powder technology. *J Baghdad College Dentistry*. 2015;27(1).
12. Koerdt S., Siebers J., Bloch W., et al. Immunohistochemical study on the expression of von Willebrand factor (vWF) after onlay autogenous iliac grafts for lateral alveolar ridge augmentation. *Head & Face Medicine*. 2013;9:40.
13. Sugihartini N., Fajri A., Rahmawati D.R. Formulation of Moringa oleifera Leaf Extract in Lotion and Gel as Sunscreen. 1st Muhammadiyah International Conference on Health and Pharmaceutical Development, 2018.
14. Areej S.D. Histological and Immunohistochemical study of the Effect of Local Application of Moringa Oleifera / Marine Collagen on Bone Healing in Rats. Master thesis College of Dentistry, Baghdad University. 2021.
15. Omede Ameh. Total polyphenolic content and antioxidant properties of moringa oleifera leaf extract. *Animal Research International*. 2016;13(2):2454–246.
16. Das K., Bose S., Bandyopadhyay A. Surface modifications and cell – materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterial*, 2007;573–585.
17. Habibovic P., Li J., van der Valk C., et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*, 2005;26:23–36.
18. Satue M., Arriero M., Monjo M., Ramis M. Quercitrin and Taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. Submitted to Phytomedicine Progress in Materials Science, 2012.
19. Depprich R., Zipprich H., Ommerborn M., et al. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head & Face Medicine*, 2008;4:30.
20. Salma Sultana. Nutritional and functional properties of Moringa oleifera. *Metabolism Open*, 2020;8:100061
21. Jason A., Luchs Jon S., Mehrara Babak J et al. Expression of Bone Morphogenetic Proteins during Membranous Bone Healing. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2001;107(1):124–134 .
22. Mohamed A.H.M. The effect of autologous bone marrow-derived stem cells with estimation of molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits (a histomorphometric, histological and immunohistochemical experimental study). PhD Thesis University of Baghdad College of Dentistry. 2012.
23. Al-Azzawi A.S., Al-Ghaban N.M.H. Histomorphometric Evaluation of the Effect of Local Application of Moringa Oleifera / Marine Collagen on Bone Healing in Rat. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 2021;9(1):225–230.
24. Schenk R.K., Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontology*. 2000;17:22–35.
25. Abadallah M.S., Ali M. Antibacterial Activity of Moringa Oleifera Leaf Extracts against Bacteria Isolated From Patients Attending General Sani Abacha Specialist Hospital Damaturu. *J Allied Pharm Sci*. 2019;61–66.
26. Albrektsson T., Chrcanovic B., Jacobsson M., Wennerberg A. Osseointegration of implants- a biological and clinical overview. *JSM Dent Surg*. 2017;2(3):1022–8.
27. Trindade R., Albrektsson T., Galli S., et al. Osseointegration and foreign body reaction: titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20:82–91.
28. Albrektsson T., Jemt T., Mölne J., et al. On inflammation-immunological balance theory-A critical apprehension of disease concepts around implants: mucositis and marginal bone loss may represent normal conditions and not necessarily a state of disease. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(1):183–9.
29. Tang L., Hu W. Molecular determinants of biocompatibility. *Expert Rev Med Devices*. 2005;2(4):493–5.
30. Albrektsson T., Dahlin C., Jemt T., et al. Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014;16(2):155–65.
31. Buabeid M.A., Yaseen H.S., Asif M., et al. Antinflammatory and Anti-Angiogenic Aattributes of Moringa olifera Lam. and its Nanoclay-Based Pectin-Sericin films. *Front. Pharmacol*. 2022;13:890938. doi: 10.3389/fphar.2022.890938.
32. Mohamed I.F., Ghani B.A., Fatalla A.A. Histological Evaluation of the Effect of LocalApplication ofPunica granatum Seed Oil on Bone Healing. *International Journal of Biomaterials*. 2022;8.
33. Othman Jassim H., Al-Ghaban N.M.H. Effect of Eucommia Ulmoides on Healing of Bon Defect Using Histological and Histomorphometric Analysis in Rat: in vivo Study. *Arch Razi Inst*. 2023;30,78(2):651–657.



Irhayyif R.A.✉, Raisan S.J.  
College of Education for Pure Sciences, Basrah, Iraq

## Significance of Assessing Correlative Changes in Total IgE and IL-33 Serum Levels in Food Allergy

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Irhayyif R.A. – conceptualization, methodology, investigation, resources, data curation, writing; Raisan S.J. – supervision, methodology, resources, data curation, writing.  
The article is published in author's edition.

Submitted: 10.01.2024

Accepted: 30.08.2024

Contacts: ahmedsalihdr2008@yahoo.com

### Abstract

---

**Introduction.** Recently, food allergy disease is considered one of the most common pathological conditions.

**Purpose.** To determine features of some immune factors blood levels in food allergy.

**Materials and methods.** In the study, a total of 90 blood samples were collected from subjects aged 7 to 49 years, including 70 blood samples of allergic individuals and 20 blood samples from healthy volunteers who constituted the control group. The diagnosis of allergy in these 90 blood samples was confirmed by an allergy test using the Atopic Kit (IMMUNOLAB GmbH/China). The total immunoglobulin (Total IgE, T.IgE) and interleukin 33 (IL-33) levels were assessed using reagents manufactured by Elabscience Company (USA).

**Results.** It was shown that 30 blood samples with positive results of clinical and laboratory tests belonged to allergic patients, 40 ones belonged to non-allergic subjects; in 20 control samples no signs of allergy were revealed. Moreover, the results obtained demonstrated a statistically significant increase in total IgE, whose concentration in allergic patients was  $157.03 \pm 136.43$  mcg/l, compared to its mean concentration in control samples ( $61.65 \pm 37.28$  mcg/l). Also, an increase in IL-33 level was observed in allergic patients with  $159.12 \pm 133.44$  mcg/l, compared to its level ( $129.90 \pm 108.28$  mcg/l) in control samples.

**Conclusion.** Total IgE and IL-33 levels correlate to a certain degree with food allergy severity.

**Keywords:** food allergy, IL-33, total IgE, immunoglobulin, immunology

---



Ирхайф Р.А.✉, Райсан С.Дж.  
Педагогический колледж естественных наук, Басра, Ирак

## Значимость оценки коррелятивных изменений в уровнях общего IgE и IL-33 сыворотки крови при пищевой аллергии

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** Ирхайф Р.А. – концепция, методология, проведение исследований, ресурсы, обработка данных, написание статьи; Райсан С.Дж. – научное руководство, методология, ресурсы, обработка данных, написание статьи. Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 10.01.2024

Принята: 30.08.2024

Контакты: ahmedsalihdr2008@yahoo.com

### Резюме

**Введение.** В настоящее время пищевая аллергия признана одним из самых распространенных патологических состояний.

**Цель.** Установление особенностей содержания в крови ряда иммунных факторов при развитии пищевой аллергии.

**Материалы и методы.** В ходе исследования было отобрано 90 образцов крови испытуемых в возрасте от 7 до 49 лет, из них 70 образцов крови людей с аллергией и 20 – здоровых добровольцев, составивших контрольную группу. Диагноз аллергии при исследовании 90 образцов крови подтверждали с помощью теста на аллергию с использованием набора Atopic Kit (IMMUNOLAB CmbH/China). В рамках исследования проводили оценку содержания общего иммуноглобулина (Total IgE, T.IgE) и интерлейкина-33 (IL-33) с использованием реагентов Elabscience Company (США).

**Результаты.** Показано, что 30 образцов крови с положительным результатом клинико-лабораторного исследования принадлежали пациентам с аллергией, 40 – испытуемым без аллергии; в 20 контрольных образцах не было выявлено признаков аллергии. Кроме того, полученные результаты свидетельствовали о статистически достоверном увеличении содержания общего IgE, концентрация которого у пациентов с аллергией составила  $157,03 \pm 136,43$  мкг/л по сравнению с его средней концентрацией в контрольных образцах ( $61,65 \pm 37,28$  мкг/л). Кроме того, выявлено повышение уровня IL-33, концентрация которого у пациентов с аллергией составила  $159,12 \pm 133,44$  мкг/л по сравнению с концентрацией ( $129,90 \pm 108,28$  мкг/л) в контрольных образцах.

**Заключение.** Уровень общего IgE и IL-33 находится в определенной зависимости от степени выраженности пищевой аллергии.

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, IL-33, общий IgE, иммуноглобулин, иммунология

## ■ INTRODUCTION

Food allergies are one of the serious problems. Fourteen types of foods listed as food allergens recognized in the European Union have been recorded, such as soybeans, milk, fish, peanuts, nuts, and others [1]. It recorded the prevalence of allergies in the United States, a rate of 9%, and in Europe, rate of 6% [2]. Mast cells are the main effector cells involved in the pathophysiology of acute allergic reactions [3]. It is significant to mention that the production of antigen-specific IgE and its attachment to the high-affinity FcεR receptors on mast cells and basement membranes upon exposure to allergens contributes to the initiation of the hypersensitivity reaction, so the role of IgE is essential in causing allergic reactions [4]. About 40% of people in Western communities suffer from hyperproduction of antibodies IgE to various environmental allergens. This hyperproduction of IgE is called atopy, and Atopy is a predisposition to diseases such as allergic rhinitis and the development of asthma or atopic dermatitis (eczema) due to environmental factors [5]. Higher levels of total IgE in the bloodstream and a higher amount of eosinophils than healthy individuals. Interleukins also play an important role in the development of allergic diseases. IL-33 is thought to accelerate respiratory tract inflammation mediated by helper cells [6]. As studied made it clear IL-33 not only acts as a cytokinin that stimulates helper cells but also as an inflammatory cytokinin in various immune responses. Studies have also evidenced that IL-33 not only activates mast cells but also activates other immune cells such as basophils and macrophages [7]. The IL-33 binds to its receptor in tissues ST2, which plays an important role in causing allergic diseases [8]. This leads to the activation of signalling pathways and the release of mediators that are involved in an important role in the development of allergic diseases. Because it is considered an alarm signal sent to alert the Immunity system after allergy, cell damage, and infection [9].

## ■ PURPOSE OF THE STUDY

To determine features of some immune factors blood levels in food allergy.

## ■ MATERIALS AND METHODS

The present study was implemented using (90) human samples collected from venous blood, which included (50) blood samples from males and (40) blood samples from females within age groups ranging between (7–49) years, residing in various places in Basra Governorate. Samples were collected randomly from people suffering from allergies. Special information was recorded for the samples of the current study according to a pre-prepared questionnaire form that encompassed (name, age, sex, medical history, geographical location, type of allergy, duration of illness, appearance of symptoms, type of symptoms, has s/he suffered other diseases).

### **Blood Sample Collection**

The present study was carried out on (90) human samples collected from venous blood, which included (50) blood samples from males and (40) blood samples from females within age groups ranging between (7–49) years old, residing in various Basrah Governorate . Human samples were randomly collected from people suffering from allergies. Special information was recorded for the samples of the current study according to a pre-prepared questionnaire form that included (name, age, gender, medical history,

geographical location, type of allergy, duration of illness, appearance of symptoms, type of symptoms, and other diseases who suffer from).

### Diagnosing Type of Allergy (Atopic Kit)

The diagnosis of food allergy was confirmed in the samples of the current study by using (Atopic Kit) as per the company's previously prepared instructions, IMMUNOLAB GmbH / China.

### Estimation of Total IgE ELISA

The Direct ELISA test was used to measure the level of total IgE (T.IgE) in the serum of the samples of the current study. This procedure was carried out by using a diagnostic kit prepared by the United States of America.

### Estimation of Interleukin 33 (IL-33)

The Direct ELISA test was used to evaluate the level of interleukin 33 (IL-33) in the serum of the samples of this study. This procedure was conducted by using a diagnostic kit prepared by the United States of America / Elabscience Company.

## ■ RESULTS

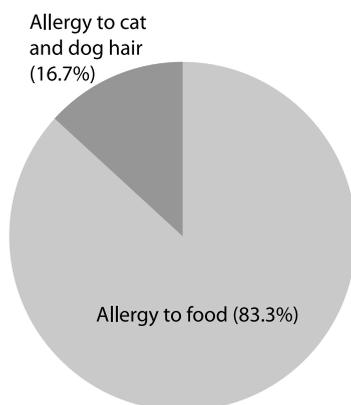
The results in the current study show that the number of patients with food allergies was 30 samples at a rate of 33.3% out of a total of 70 samples compared with control samples (table 1).

**Table 1**  
Distribution of samples of the current study according to sex and age groups

Status	Patient (n=70) No. (%)	Control (n=20) No. (%)	Total
<b>Sex</b>			
Male	37 (41.1)	13 (14.5)	50 (55.5)
Female	33 (36.7)	7 (7.7)	40 (44.4)
<b>Age group/year</b>			
7–16	20 (22.2)	5 (5.6)	25 (27.8)
17–26	31 (34.4)	12 (13.3)	43 (47.7)
27 and more	19 (21.2)	3 (3.3)	22 (24.5)

**Table 2**  
Distribution of the Allergic samples according to sex and age groups

Status	Allergic (n=30) No. (%)	Non-allergic (n=40) No. (%)	Control (n=20) No. (%)	Total
<b>Sex</b>				
Male	25 (27.8)	12 (13.3)	13 (14.5)	50 (55.6)
Female	5 (5.5)	28 (31.1)	7 (7.7)	40 (44.4)
<b>Age group/year</b>				
7–16	10 (11.1)	11 (12.2)	5 (5.6)	26 (29)
17–26	13 (14.4)	17 (18.9)	12 (13.3)	42 (46.6)
27 and more	7 (7.8)	12 (13.3)	3 (3.3)	22 (24.4)



**Fig. 1. Distribution of study samples according to type of allergy**

Also noted in this study was that the percentage of males with food allergies was higher than that of females, which was (27.8%). Likewise, the second age group (17–26%) had the highest rate of food allergies compared to other age groups at rate (14.4%), with a significant difference at the probability level of  $p \leq 0.05$  (table 2).

**Distribution of study samples according to type of allergy**

The results of the current study, shown in Figure 1, showed that the percentage of samples allergic to food was 25 samples, representing (83.3%) out of a total of 30 samples, and there were only five samples, representing (16.7%).

**Level of T.IgE**

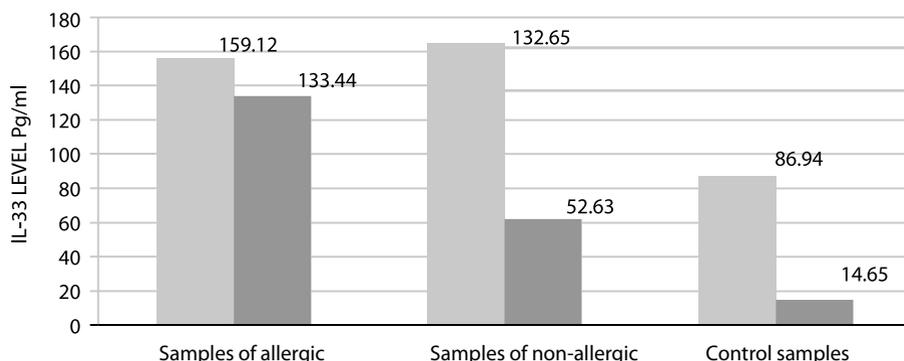
The results of this study recorded an increase in the levels of total immunoglobulin type E (T.IgE) concentrations in patients with food allergies, as the average concentration for the allergic patients was  $157.03 \pm 136.43$  mcg/l compared with control samples, as shown in table 3 was  $61.65 \pm 37.28$  mcg/l.

**Level of interleukin 33 (IL-33)**

As stated in figure 2, there was a significant increase in the concentration of interleukin 33, as its average concentration was  $159.12 \pm 133.44$  pg/ml in the people allergic to the foods under study, compared to the control samples, which was at a rate of  $86.94 \pm 14.65$  pg/ml for the concentration of interleukin 33.

**Table 3**  
**Concentration of T.IgE in the serum of the studied samples: allergic, non-allergic, and control samples**

Immune globulin	Allergy samples (n=30) Mean±SD mcg/l	%95 CI	Non-allergic (n=40) Mean±SD mcg/l	%95 CI	Control (n=20) Mean±SD mcg/l	%95 CI	Prp value
T.IgE	$136.43 \pm 157.03$	13.38–557.1	$59.57 \pm 87.63$	12.31–277.5	$37.28 \pm 61.65$	89.3–107	$\leq 0.05$



**Fig. 2. Concentrations of interleukin 33 (IL-33) in the samples of allergic, non-allergic, and control samples**

### The relationship between T.IgE and IL-33 in the serum

**Table 4**  
Depicts the correlation of T.IgE with IL-33 in the serum of samples of people suffering from food allergies and control samples

Factor	Samples of people sensitive to food allergy (25 samples), Mean±SD
T. IgE	148.58±153.37
IL-33	69.22±138.91

## DISCUSSION

Immunoglobulin (IgE) is mainly correlated with allergic reactions and is one of the five immunoglobulins produced by the immune system. It is principally perceived in the lungs, skin, and mucous membranes. The IgE antibody levels are often high in people who suffer from allergic symptoms as they react to foreign substances, such as food allergens, animal dander, and pollen [10]. By the same token [11] demonstrated that T.IgE plays an important role in diagnosing food allergies, and concluded that T.IgE is of predictive value for people to determine their allergy or predisposition to developing allergic diseases in the future. In a study conducted [12], what was revealed is an increase in the concentration of T.IgE by (65%) in people sensitive to various food allergens [13] recorded an increase in T.IgE by (60%) in people allergic to sedge and carpus pollen in Iraq. Also observed an increase in the concentration of T.IgE in people allergic to peanuts in Iraq by (36.46%), compared to control samples [14].

Cytokines are among the most important inflammatory factors in the development of allergies. Therefore, a large number of researchers have been working to uncover interleukin 33 and its role in food allergies [15]. Interleukin 33 activates helper cells due to the binding of interleukin 33 to its ST2 receptor, which increases after stimulation by a food antigen. Thus, helper cells work to stimulate mast cells and remove their granules, such as the release of histamine [16]. Authors agreed in terms of a rise in the concentration of interleukin 33 in intestinal and esophageal biopsies as a result of food allergy to its antigens [17]. An increase in the concentration of interleukin 33 in allergic people was

also confirmed in many studies, such as the study of [18], where the level of interleukin was detected in people who had rhinitis. Allergy level was significant at 0.0035, compared with control samples, and its level for people suffering from asthma was realized at a significant level of  $\leq 0.050.08$ , compared with control samples. In [19] demonstrated that interleukin 33 was significantly increased in all patients with allergic rhinitis compared to control samples, with a significant difference of  $\leq 0.05$  0.01.

## ■ CONCLUSION

The present study concluded that T.IgE and IL-33 have a role in the development and severity of food allergy diseases.

---

## ■ REFERENCES

1. Muraro A. The European Academy of Allergy and Clinical immunology (EAACI) Advocacy Manifesto Tackling the Allergy Crisis in Europe – Concerted Policy Action Needed. EAACI – EU Liaison Office: Brussels, Belgium; 2015.
2. Gupta R.S., Warren C.M., Smith B.M. et al. Prevalence and severity of food allergies among US adults. *JAMA Netw Open.* 2019;2(1):e1856303.
3. El Ansari Y.S., Kanagaratham C., Oettgen H.C. Mast Cells as Regulators of Adaptive Immune Responses in Food Allergy. *Yale J Biol Med.* 2020 Dec 29;93(5):711–718.
4. Amaresekera M. Immunoglobulin E in health and disease. *Asia Pac Allergy.* 2011;1(1):12–15.
5. Černiauskiė M., Bagdonaitė L., Karčiauskaitė D., Kvedariėnė V. (2022). Prevalence and Variability of Allergen-Specific Immunoglobulin E in Patients with Elevated Tryptase Levels. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research.* 2022;28:e937990-1.
6. Cho K.A., Suh J.W., Sohn J.H. et al. IL-33 induces Th17-mediated airway inflammation via mast cells in ovalbumin-challenged mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302:L429–40.
7. Oboki K., Ohno T., Kajiwara N., et al. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 2010;59:143–160.
8. Baba Y., Maeda K., Yashiro T., et al. GATA2 is a critical transactivator for the human IL1RL1/ST2 promoter in mast cells/basophils: opposing roles for GATA2 and GATA1 in human IL1RL1/ST2 gene expression. *J Biol Chem.* 2012;287:32689–96.
9. Moussion C., Ortega N., Girard J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel «alarmin»? *PLoS One.* 2008;3:e3331.
10. Kumar S., Verma A.K., Das M., Dwivedi P.D. Allergenic diversity among plant and animal foods and their allergenicity. *Food Rev Int.* 2012;28:277–98.
11. Chung D., Park K.T., Yarlagadda B., et al. The significance of serum total immunoglobulin E for in vitro diagnosis of allergic rhinitis. *In International forum of allergy & rhinology.* 2014;4(1):56–60.
12. Channng M.L., Cancul Liu Y.H., Pei L.C., Shao B. Analysis of total immunoglobulin E and specific immunoglobulin E of 3,721 patients with allergic disease. *Biomedical reports.* 2015;3:573–577.
13. Jeoe H.T., Raisan S.J. Effect of Typha Domingensis Plant Antigen on IgE, Cd3, Cd300 Parameter of Allergic Asthmatic and Bronchial Patients in Basra, Iraq. *NVEO – Natural Volatiles & Essential Oils Journal.* 2021;157–164.
14. Mahjar N.T., Raisan S.J. Determination the Relationship of Interleukin IL-17 to Peanut Allergy in Basrah Governorate. *University of Thi-Qar Journal of Science.* 2022;9(1):87–91.
15. Salvo E., Ventura-Spagnolo E., Casciaro M., Navarra Gangemi S. IL-33/IL-31 axis: a potential inflammatory pathway. *Mediators of inflammation,* 2018.
16. Tordesillas L., Goswami R., Benedé S., et al. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J. Clin. Investig.* 2014;124:4965–4975.
17. Judd L.M., Heine R.G., Menheniott T.R., et al. Elevated IL-33 expression is associated with pediatric eosinophilic esophagitis, and exogenous IL-33 promotes eosinophilic esophagitis development in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2016;310:G13–G25.
18. Gluck J., Rymarczyk B., Rogala B. Serum IL-33 but not ST2 level is elevated in intermittent allergic rhinitis and is a marker of the disease severity. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society.* 2012;61(6):547–50.
19. Vocca L., Di Sano C., Uasuf C.G., et al. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology.* 2015;220(8):954–63.



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.13.4.012>  
УДК 616.155.194.18-07-053.31



Дикая Т.В.<sup>1</sup>, Козлякова О.В.<sup>✉1</sup>, Артюшевская М.В.<sup>2,3</sup>, Сухарева А.П.<sup>3</sup>, Скурко И.А.<sup>3</sup>,  
Климович О.В.<sup>1</sup>, Заяц И.А.<sup>1</sup>, Цыганкова О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Городской центр трансфузиологии 6-й городской клинической больницы,  
Минск, Беларусь

<sup>2</sup>Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения  
Белорусского государственного медицинского университета, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Клинический родильный дом Минской области, Минск, Беларусь

## Интегрированный подход к диагностике гемолитической болезни новорожденного по системе АВО: клинический случай

**Конфликт интересов:** не заявлен.

**Вклад авторов:** концепция статьи, редактирование, обработка, написание текста – Дикая Т.В., Козлякова О.В., Артюшевская М.В., Сухарева А.П., Климович О.В., Цыганкова О.В.; сбор материала и его обработка – Скурко И.А., Заяц И.А.

**Информированное согласие:** авторы имеют подписанные информированные согласия на анонимное опубликование данных в медицинском издании.

Подана: 08.07.2024

Принята: 01.11.2024

Контакты: olga-kozlyakova@yandex.by

### Резюме

**Введение.** Для своевременной диагностики генеза и прогнозирования гемолитической болезни новорожденного по системе АВО важна комплексная интерпретация как лабораторных, так и клинических показателей.

**Цель.** Представить клинический случай интегрированного подхода к диагностике гемолитической болезни новорожденного.

**Материалы и методы.** Проведен динамический анализ лабораторных и клинических данных у беременной женщины и ее ребенка с гемолитической болезнью новорожденного.

**Результаты.** При иммуногематологическом исследовании крови беременной Ш. было установлено: группа крови по системе АВО – O(I), по системе Rh – антиген D-отрицательный, Rh-фенотип – Ccddee. В сыворотке крови матери определяли группоспецифические антитела с применением гелевых технологий в автоматическом режиме (с использованием автоматического иммуногематологического анализатора ИН-500) анти-A (IgM) в титре 1:64 и анти-B (IgM) в титре 1:256, а также анти-B (IgG) в титре 1:16. У младенца установлено: группа крови по системе АВО – B(III), по системе Rh – антиген D-положительный, Rh-фенотип – CcDee, положительный полиспецифический прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ). Проведение моноспецифического ПАГТ на эритроцитах новорожденного основывалось на определении иммуноглобулинов IgG. Для идентификации антител провели элюирование связанных с эритроцитами антител с последующей идентификацией антител в непрямом антиглобулиновом тесте (НАГТ). Элюат с эритроцитов ребенка содержал иммунные анти-B антитела (IgG). При исследовании сыворотки новорожденного в НАГТ

с тест-эритроцитами выявлены анти-В антитела класса IgG. Динамический анализ клинико-лабораторных данных у новорожденного ребенка соответствовал клинической картине гемолитической болезни новорожденного. Увеличение показателя незрелых ретикулоцитов, нормальное значение содержания гемоглобина в ретикулоцитах в неонатальном периоде у младенца указывают на отсутствие дефицита железа в качестве причины анемии у данного пациента.

**Заключение.** Комплексный анализ иммуногематологических исследований (как прямого, так и непрямого антиглобулинового теста у матери и новорожденного, исследование элюата с эритроцитов у новорожденного ребенка) и клинико-лабораторных показателей у новорожденного ребенка (повышение концентрации билирубина, снижение гемоглобина и др.) существенно помогает в ранней диагностике, определении генеза гемолитической болезни новорожденного и прогнозировании выраженности гемолиза.

**Ключевые слова:** гемолитическая болезнь новорожденного, АВО-несовместимость, антиглобулиновый тест, элюат, фракции ретикулоцитов

---

Dzikaya T.<sup>1</sup>, Kazliakova V.<sup>1</sup>✉, Artsiusheyskaya M.<sup>2,3</sup>, Sukhareva A.<sup>3</sup>, Skurko I.<sup>3</sup>, Klimovich V.<sup>1</sup>, Zayats I.<sup>1</sup>, Tsyhankova V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> City Transfusiology Center of the 6<sup>th</sup> City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Institute of Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> Clinical Maternity Hospital of the Minsk Region, Minsk, Belarus

## Integrated Approach to the Diagnosis of ABO Hemolytic Disease of Newborn: A Case Report

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Author's contribution:** article concept, editing, processing, writing – Dzikaya T., Kazliakova V., Artsiusheyskaya M., Sukhareva A., Klimovich V., Tsyhankova V.; material collection and processing – Skurko I., Zayats I.

**Informed consent:** the authors have signed informed consents for anonymous publication of patients' data in a medical journal.

Submitted: 08.07.2024

Accepted: 01.11.2024

Contacts: olga-kozlyakova@yandex.by

### Abstract

---

**Introduction.** Comprehensive interpretation of laboratory and clinical indicators is crucial for timely diagnosis and prognosis of ABO hemolytic disease of the newborn (ABO HDN).

**Purpose.** To present a clinical case demonstrating an integrated approach to diagnosing hemolytic disease of the newborn.

**Materials and methods.** A dynamic analysis of laboratory and clinical findings of a pregnant woman and her child with HDN was performed.

**Results.** The pregnant woman Sh. was found to have blood group O, RhD-negative, Ccddee phenotype, according to immunohematological tests. Group-specific antibodies were detected in the mother's serum using gel technology (automatic immunohematological analyzer IH-500): anti-A (IgM) at a titer of 1:64, anti-B (IgM) at a titer of 1:256, and anti-B



(IgG) at a titer of 1:16. The newborn had blood group B, RhD-positive, phenotype CcDee, with a positive polyspecific direct antiglobulin test (PAGT). Monospecific PAGT on the newborn's erythrocytes revealed the presence of IgG immunoglobulins. Erythrocyte-bound antibodies were eluted and identified in an indirect antiglobulin test (IAGT). The eluate from the newborn's erythrocytes contained immune anti-B antibodies (IgG), which were also detected in the serum by IAGT. Clinical and laboratory data analysis corresponded to the clinical picture of HDN. An increased immature reticulocyte count and a normal hemoglobin reticulocyte count in the neonatal period indicated the absence of iron deficiency as a cause of anemia in this patient.

**Conclusion.** The comprehensive analysis of immunohematological tests (both direct and indirect antiglobulin test (AGT) in the mother and newborn, and eluate erythrocyte test in the newborn) along with clinical and laboratory findings of the newborn (increased bilirubin level, decreased hemoglobin, etc.) aids substantially in early diagnosis, determining hemolytic disease genesis and predicting hemolysis severity in HDN.

**Keywords:** hemolytic disease of the newborn, ABO incompatibility, antiglobulin test, eluate, reticulocyte fractions

---

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Развитие гемолитической болезни новорожденного (ГБН) остается актуальной проблемой как для акушеров-гинекологов, так и для неонатологов. В Республике Беларусь за 2020 г. заболеваемость ГБН составила 6,41 на 1000 живорожденных детей. В настоящее время вследствие проводимой профилактики резус-конфликта в клинической практике наблюдается рост развития ГБН при ABO-несовместимости [1]. Часто неонатологи сталкиваются со сложностью определения генеза ГБН, а следовательно, и прогноза течения заболевания у новорожденных детей при наличии одновременно возможного конфликта как по системе ABO, так и по системе Rh. Общепринятый прямой антиглобулиновый тест (ПАГТ) не имеет специфичности и не может быть использован для дифференциальной диагностики [2]. Поэтому поиск лабораторных маркеров ГБН для уточнения генеза и прогнозирования течения заболевания остается актуальным в настоящее время.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представить клинический случай интегрированного подхода к диагностике гемолитической болезни новорожденного.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен анализ лабораторных (иммуногематологических) данных у беременной Ш. и клинико-лабораторных показателей ее новорожденного ребенка.

Иммуногематологические исследования образца крови матери, выполненные с использованием автоматического анализатора IH-500, сводились к проведению скрининга аллоиммунных антиэритроцитарных антител (реагент ID DiaCell I–II–III и ID-карты LISS/Coombs) и определению:

- 1) группы крови по системе ABO с использованием ID-карт DiaClon ABO/D + Reverse Grouping;
- 2) фенотипа эритроцитов системы Rh, включая типирование эритроцитов системы Kell (K) с использованием ID-карт DiaClon Rh-Subgroups + K;
- 3) титров антител по системе ABO (анти-A и анти-B): нормальных (естественных) полных антител класса IgM методом агглютинации в геле (ID-карты NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins) и иммунных неполных антител класса IgG (с использованием ID-карт Coombs Anti-IgG).

Иммуногематологические исследования образца крови новорожденного на автоматическом анализаторе IH-500 состояли:

- 1) в определении у новорожденного антигенов по системам ABO/Rh и проведении ПАГТ с использованием ID-карт для новорожденных ABO/Rh for Newborns;
- 2) определении фенотипа эритроцитов системы Rh, включая типирование эритроцитов системы Kell (K) с использованием ID-карт DiaClon Rh-Subgroups + K;
- 3) проведении ПАГТ: моноспецифического (ID-карты Coombs Anti-IgG, ID-карты DC-Screening I);
- 4) определении рисков гемолиза в ID-картах DAT IgG-Dilution;
- 5) определении субклассов иммуноглобулинов IgG1 и IgG3 и оценке рисков гемолиза в ID-картах DAT IgG1/IgG3;
- 6) исследовании сыворотки новорожденного на выявление группоспецифических аллоантител анти-B (класса IgG) в ID-картах Coombs Anti-IgG со стандартными эритроцитами группы B(III) в НАГТ.

Проведен динамический анализ клинических и лабораторных данных у ребенка с ГБН.

С использованием автоматического анализатора Sysmex XN-350 оценено количество эритроцитов (RBC), определены концентрация гемоглобина (Hb), гематокрит (Ht), средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), абсолютное и относительное количество ретикулоцитов (RET).

Параллельно были проанализированы параметры, характеризующие степень зрелости ретикулоцитов: фракция ретикулоцитов низкой флуоресценции (LFR), фракция ретикулоцитов средней флуоресценции (MFR), фракция ретикулоцитов высокой флуоресценции HFR, а также фракция незрелых ретикулоцитов (IRF), являющаяся суммой HFR и MFR крови новорожденного с ГБН в неонатальном периоде. Изучен показатель гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-HE).

Для достижения поставленной цели исследования были сформулированы следующие задачи:

- 1) провести анализ лабораторных (иммуногематологических) данных у беременной Ш. и ее новорожденного ребенка;
- 2) провести динамический анализ эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей, уровня билирубина и течения неонатального периода у новорожденного Ш.

## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Клинический случай**

Беременная женщина Ш. 1986 г. р. наблюдалась во время беременности в Городском центре трансфузиологии и учреждения здравоохранения «б-я городская клиническая больница» г. Минска. Наблюдение и обследование проводилось в соответствии с клиническим протоколом «Медицинское наблюдение и оказание



медицинской помощи женщинам с резус-иммунизацией и другими формами изоиммунизации», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 30 декабря 2022 г. № 128. В анамнезе беременной – вторичное бесплодие и 3 выкидыша. При иммуногематологическом исследовании было установлено: группа крови по системе ABO – O(I), по системе Rh – антиген D-отрицательный, Rh-фенотип – Ccddee. В 28 недель беременности был введен иммуноглобулин человека антирезус анти-D (анти-RhD), повторно иммуноглобулин человека анти-RhD был введен после родов в первые сутки после рождения ребенка.

В сроке гестации 38 недель (267 дней) беременной женщине в плановом порядке выполнена операция кесарева сечения в Клиническом родильном доме Минской области. Родился мальчик с массой тела 3680 г, ростом 52,0 см с оценкой по шкале Апгар 8/9 баллов. Медицинская помощь оказывалась в отделении для новорожденных детей и в педиатрическом отделении для новорожденных (с перинатальной патологией и недоношенных) согласно клиническому протоколу «Оказание медицинской помощи в неонатологии», утвержденному приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 18 апреля 2022 г. № 34. Все данные получены из форм первичной медицинской документации акушерско-гинекологической и педиатрической служб Республики Беларусь: «История развития новорожденного» (форма 097/у), «История родов» (форма 096/у), «Медицинская карта стационарного больного» (форма 003/у).

У младенца установлено: группа крови по системе ABO – B(III), по системе Rh – антиген D-положительный, Rh-фенотип – CcDee. На основании развития гипербилирубинемии (прирост составил 6,4 мкмоль/л/час) к концу 1-х суток жизни, уровня гемоглобина при рождении ниже возрастной нормы и последующего его снижения со 140 г/л (при рождении) до 115 г/л (на 2-е сутки жизни), положительного ПАГТ было предположено развитие ГБН.

По данным литературы, несовместимость матери и плода по системе ABO обеспечивает в определенной степени защиту от аллоиммунизации по системе Rh. Несовместимость по группе крови A(II) между матерью и плодом создает 90%-ю защиту от аллоиммунизации к RhD-антигену, а несовместимость по группе крови B(III) дает только 55%-ю защиту [3]. Поэтому в данном случае необходимо было установить генез гемолиза для постановки диагноза и определить прогноз течения ГБН для выбора оптимальной тактики ведения.

Несмотря на общепринятое использование ПАГТ при диагностике ГБН, сегодня значимость этого теста является спорной. Как положительный, так и отрицательный результат не играет определяющей роли в установлении данного диагноза. До 90% детей с положительным ПАГТ не имеют признаков гемолитической болезни, и наоборот – были сообщения об отрицательном тесте у младенцев с ABO – ГБН [4]. Особенно для неонатальных эритроцитов ограничена чувствительность ПАГТ к анти-A (IgG) и анти-B (IgG). Поэтому в большинстве случаев характерные клинические симптомы при ABO-несовместимости протекают при отрицательном ПАГТ. В случае подозрения на ГБН неясного генеза рекомендуется использовать непрямой антиглобулиновый тест (НАГТ), в котором используют сыворотку новорожденного и стандартные эритроциты ABO (в зависимости от групповой принадлежности ребенка A(II) или B(III)), так как данный тест является более чувствительным к материнским аллоантителам в крови плода. В качестве лабораторного диагностического метода

в последние годы предлагается также анализ антител, элюированных с эритроцитов новорожденного. Данный метод состоит в использовании приема тепловой элюции антител с поверхности эритроцитов и последующем проведении идентификации антител. Анализ элюатов во многом более чувствителен к определению иммунных анти-А и анти-В антител по сравнению с прямым полиспецифическим антиглобулиновым тестом, и его можно использовать дополнительно при определении типа ГБН.

Для уточнения диагноза было проведено параллельное исследование образцов крови матери и новорожденного ребенка.

Установлено наличие в сыворотке крови матери ABO-антител, направленных против антигенов новорожденного (мать O(I) – новорожденный B(III)). Сыворотка крови матери не содержала антител другой специфичности, кроме анти-А и анти-В. Элюат с эритроцитов ребенка содержал анти-В антитела (IgG) в низком титре.

Был выставлен диагноз: ГБН (изоиммунизация по ABO) P55.1. Желтушно-анемическая форма, среднетяжелое течение.

Известно, что антитела класса IgG делятся на четыре основных подкласса. Антитела подклассов IgG1, IgG3, IgG4 беспрепятственно проникают через плаценту. С увеличением их концентрации в крови матери и ребенка повышается вероятность развития ГБН. Интенсивность гемолитического процесса зависит от подкласса IgG. Диагностическое значение имеют прежде всего IgG1 и IgG3, так как иммуноглобулины этих подклассов намного легче взаимодействуют с Fc-рецепторами клеток, чем IgG2 и IgG4. Кроме того, IgG3 обладают большей аффинностью к рецепторам макрофагов, что объясняет их более высокую гемолитическую активность. У беременных женщин характер изменения титров аллоантител по сравнению с небеременными женщинами и в динамическом наблюдении может быть различным: постоянным, снижающимся, возрастающим и скачущим [5–7]. Есть мнение о том, что частая смена подъемов и спадов титра аллоантител в первой половине беременности является характерным признаком иммунноконфликтных реакций между матерью и плодом [8]. Но насколько критичен пороговый уровень антител, при котором может развиться ГБН, остается спорным вопросом. В исследовании Cariani L. и соавт. показано, что нет определенных ассоциаций между титрами материнских анти-А/В антител IgG класса и риском ABO – ГБН [9]. Однако в большинстве работ по изучению ABO – ГБН выявлена корреляция между высокими титрами аллоантител у матери и степенью тяжести ABO – ГБН. Одни исследователи считают, что титры более 1:64 уже являются критичными [10], другие – что только титры более 1:128 или 1:512 являются опасными [11, 12]. У новорожденных с ГБН и отрицательным ПАГТ уровень IgG3 иногда слишком низок для детекции в прямом антиглобулиновом тесте, но его бывает достаточно для развития гемолиза [13].

Новорожденный ребенок Ш. получал следующее лечение: введение внутривенного иммуноглобулина, фототерапия, назначение фолиевой кислоты и витамина D<sub>3</sub>. Выписан в удовлетворительном состоянии на 19-е сутки жизни.

Учитывая развитие анемии, проведен динамический анализ эритроцитарных и ретикулоцитарных показателей в общем анализе крови у ребенка Ш. Соответствующие данные представлены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, у новорожденного ребенка Ш. в течение неонатального периода отмечается снижение эритроцитарных показателей (количество RBC на первые сутки составило  $3,57 \times 10^{12}/л$  и снизилось до  $3,14 \times 10^{12}/л$  на 18-е сутки).



**Таблица 1**  
**Динамика эритроцитарных показателей у новорожденного ребенка Ш.**

**Table 1**  
**Evolution of erythrocyte indices in the newborn Sh.**

Сутки жизни	Тест, ед. измерения											
	Er, 10 <sup>12</sup> /л	HGB, г/л	HCT, %	MCV, фл	MCH, пг	MCHC, г/л	RDW-CV, %	RDW-SD, фл	MicroR, %	MacroR, %	Нуро-HE, %	Hyper-HE, %
1	3,57	140	38,1	106,7	39,2	367	17,6	64,1	1,1	16,5	1,1	2,2
2	2,93	115	32,0	109,2	39,2	359	18,4	70,1	0,9	18,3	1,0	2,5
11	3,12	115	31,4	100,6	36,9	366	14,5	53,1	1,1	7,6	2,5	1,6
18	3,14	112	30,6	97,5	35,7	366	14,6	52,4	1,6	5,8	1,4	1,2

**Таблица 2**  
**Динамика ретикулоцитарных показателей у новорожденного ребенка Ш.**

**Table 2**  
**Evolution of reticulocyte indices in the newborn Sh.**

Сутки жизни	Тест, ед. измерения					
	RET, 10 <sup>9</sup> /л	RET, %	IRF, %	Ret-HE, пг	RBC-HE, пг	Delta-HE, пг
1	366,3	10,26	46,4	37,0	33,8	3,2
2	386,5	13,19	57,9	34,1	34,6	-0,5
11	80,2	2,57	36,4	31,8	32,3	-0,5
18	103,0	3,28	32,0	32,0	32,7	-0,7

Уровень HGB на 18-е сутки составил 112 г/л, HCT – 30,6%. Показатели MCV, MCH, MCHC, RDW-CV, RDW-SD, MacroR, MicroR, Нуро-HE, Hyper-HE сохранялись в пределах возрастной нормы.

При рождении у ребенка Ш. уровень абсолютного и относительного количества RET составил 366,3×10<sup>9</sup>/л (10,26%) с последующим повышением до 386,5×10<sup>9</sup>/л (13,19%) на 2-е сутки как ответ на развитие анемии. Показатель IRF сохранялся высоким в течение всего периода наблюдения (табл. 2).

Значение Ret-HE было в пределах возрастной нормы у новорожденных детей [14]. Увеличение показателя IRF, нормальное значение содержания гемоглобина в ретикулоцитах указывают на отсутствие дефицита железа в качестве причины анемии.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включение иммуногематологических исследований, таких как поли-/моноспецифический ПАГТ, а также НАГТ образцов крови новорожденного, дополнительное исследование элюата после проведения тепловой элюции эритроцитов у новорожденного в НАГТ в совокупности с комплексным анализом клинико-лабораторных показателей (повышение концентрации билирубина, снижение гемоглобина и др.) существенно помогают в определении генеза ГБН и определении тактики ведения пациента.

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Obuhova P.S., Kachanov A.V., Pozdnyakova N.A., et al. ABO-Incompatibility of Mother and Fetus: The Role of Anti-Glycan Alloantibodies in the Hemolytic Disease of Newborn. *Medical Immunology*. 2021;23(1):17–34. doi: 10.15789/1563-0625-AOM-1977 (in Russian)
2. Hadley A.G. Laboratory assays for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transpl. Immunol.* 2002;10(2–3): 191–198.
3. Sidelnikova V.M., Antonov A.G. (2004) *Hemolytic disease of the fetus and the newborn*. Moscow: Triad-X. (in Russian)
4. Petrenko Yu.V., Ivanov D.O., Cherednikova E.S., et al. Analysis of the hemolytic disease of newborn with conflicts ABO-system. *Vestnik Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii* [Bulletin of the Russian Military Medical Academy]. 2012;4:67–70. (in Russian)
5. Antonov A.G., Degtyarev D.N., Narogan M.V., et al. Hemolytic disease of the fetus and newborn. Clinical recommendations. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obucheniye*. 2018;6(2):131–157. (in Russian)
6. Aydin M., Deveci U., Orman A., et al. Is the Antiglobulin Test a Good Marker for Predicting the Development of Hemolytic Disease of the Newborn in ABO Incompatibility? *Pediatr. Neonatol.* 2016;57(5):449. doi: 10.1016/j.pedneo.2015.11.006
7. Ukita M., Takahashi A., Nunotani T., et al. IgG subclasses of anti-A and anti-B antibodies bound to the cord red cells in ABO incompatible pregnancies. *Vox Sang.* 1989;56(3):181–186.
8. Mineeva N.V. (2020) *Human Blood Groups. Fundamentals of immunohematology*. St. Petersburg: Publishing and printing complex Gangut. (in Russian)
9. Cariani L., Romano E.L., Martinez N., et al. ABO-haemolytic disease of the newborn (ABO-HDN): Factors influencing its severity and incidence in Venezuela. *J. Trop. Pediatr.* 1995;41(1):14–21.
10. Owa J.A., Durosini M.A., Alabi A.O. Determinants of severity of neonatal hyperbilirubinaemia in ABO incompatibility in Nigeria. *Trop. Doct.* 1991;21(1):19–22.
11. Li P., Pang L.H., Liang H.F., et al. Maternal IgG anti-A and anti-B titer levels screening in predicting ABO hemolytic disease of the newborn: a meta-analysis. *Fetal Pediatr. Pathol.* 2015;34(6):341–350.
12. Ye H.H., Huang H.H., Wang X.L., et al. Analysis of correlation between IgG titer of pregnant women and neonatal hemolytic complications of different blood groups. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2017;25(5):1532–1536. (in Chinese)
13. Kaplan M., Na'amad M., Kenan A., et al. Failure to predict hemolysis and hyperbilirubinemia by IgG subclass in blood group A or B infants born to group O mothers. *Pediatrics*. 2009;123(1):e132–137.
14. Löfving A., Domellöf M., Hellström-Westas L., et al. Reference intervals for reticulocyte hemoglobin content in healthy infants. *Pediatr Res.* 2018;84(5):657–661. doi: 10.1038/s41390-018-0046-4

НАШИ ОПЫТ, ТЕХНИЧНОСТЬ, ЭСТЕТИКА –  
ВАШЕ ПОПАДАНИЕ В ЦЕЛЬ!



220035, Республика Беларусь, г. Минск,  
ул. Тимирязева, 67, офис 1103  
+375 17 3221678; +375 29 3499732  
e-mail: office@recipe.by



ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ  
ИЗДАНИЯ