

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

2025, том 14, № 4

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics Eastern Europe

International Scientific Journal

2025 Volume 14 Number 4



Бовенит, или новый нефрит, – типичный минерал гидротермально измененных гипербазитов и контактово-измененных пород карбоната кальция. Встречается в виде жил, пластообразных залежей и вкрапленников преимущественно в Италии и Америке. Назван в честь своего первооткрывателя – Джорджа Боуэна, который в 1822 году опознал находку как нефрит, однако позже выяснилось, что, несмотря на схожую структуру, бовенит отличается гораздо меньшей твердостью.

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

2025, том 14, № 4

2025 Volume 14 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:

220040, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. Богдановича, 112, пом. 1Н, офис 3
Тел.: +375 17 322-16-59
e-mail: lab@recipe.by

Address:

112 Bogdanovicha st., room 1N, office 3,
Minsk, 220040, Republic of Belarus
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 "Kreitiv 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: 21.11.2025
Формат 70×100 1/16 (165×240 мм)
Печать офсетная
Тираж 1000 экз.
Заказ №

Sent for the press: 21.11.2025
Format 70×100 1/16 (165×240 mm)
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», 2025

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2025

© "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", 2025

© Design and decor of UE "Professional Editions", 2025

Главные редакторы:

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

Припутневич Татьяна Валерьевна,

чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., 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)
Лялюков 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

2025, том 14, № 4

2025 Volume 14 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.
Реестровая запись 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. Катынское,
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 «Кризитив 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: 21.11.2025
Дата выхода в свет: 01.12.2025
Формат 70×100 ¹/₁₆ (165×240 мм)
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», 2025

Russia

The journal is registered

by the Federal Service for Supervision of Communications, Information
Technology, and Mass Media (Roskomnadzor) on August 25, 2023
Registry entry 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: 21.11.2025
Release date: 01.12.2025
Format 70×100 ¹/₁₆ (165×240 mm)
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", 2025

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., 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:

Alekhnovich 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)

Ilina 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. Masharov (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!

На протяжении последних трех лет структура оглавления журнала сводилась к информации об отрасли медицины, затронутой содержанием статьи (кардиология, онкология и др.), и представленному через косую черту названию области специальности «клиническая лабораторная диагностика», а также характеру содержания опубликованной статьи и ее отличительным чертам. Такое нововведение было призвано привлечь внимание врачей клинических специальностей к выполненному исследованию. Вместе с тем, как выяснилось, главным в содержании большинства публикуемых статей оказался вклад их авторов в выполнение практико-ориентированных фундаментальных исследований, разработку новых технологий и тестов лабораторно-диагностического исследования. С учетом этого обстоятельства редакционной коллегией было принято решение возвратиться к хорошо устоявшейся в течение всех предыдущих лет практике представления оглавления, состоящего в указании области специальности «лабораторная диагностика» и через косую черту особенностей (технологических и других) выполнения работы, а также ее значимости (в целом либо для определенного контингента врачей-специалистов).

В представленном предновогоднем номере основное внимание уделено клинической микробиологии как одной из важных субдисциплин специальности «клиническая лабораторная диагностика». Отчасти это связано с тем, что в настоящее время ее представителями для решения поставленных задач широко используются молекулярно-биологические и другие высокотехнологичные методы лабораторного исследования. Отмеченная тенденция коснулась не только области клинической микробиологии и близкой к ней клинической инфектологии, но также и направления, касающегося выполнения эпидемиологических исследований, что позволило ряду известных специалистов Российской Федерации предложить термин «клиническая лабораторная эпидемиология». Именно такая одноименная рубрика была применена к представленной сотрудниками Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (Поклонской Н.В., Амвросьевой Т.В., Колтуновой Ю.Б., Бельской И.В., Ковчур О.В.) оригинальной статье «Молекулярные механизмы генетического разнообразия норовирусов, циркулировавших в Беларуси в 2009–2024 гг.», открывшей этот выпуск, поскольку она отражает широкомасштабное выполнение молекулярно-эпидемиологических исследований.

Авторы ряда статей добились больших успехов в разработке новых направлений и технологий клинико-лабораторного исследования, что придает выполненным с их участием работам инновационный характер. Так, сотрудниками Гродненского государственного медицинского



университета и Гродненской университетской клиники Лемешем А.В., Якубцевичем Р.Э. предложены новые лабораторные тесты для диагностики клостридиальной инфекции у пациентов с сепсисом. Сотрудником Белорусского государственного медицинского университета Лямцовой А.К. с успехом был использован ПЦР-анализ в сочетании с секвенированием для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов с целью установления этиологии перипротезной инфекции суставов.

Уделено внимание не только внедрению в практику здравоохранения современных методов клинической аналитики, но и новой трактовке результатов клинко-лабораторного исследования (в том числе выполненного с применением традиционных методов анализа), что вносит весомый вклад и в клинко-лабораторную информатику. Так, в статье Липницкого А.Д., выполнившего исследование на базе Могилевской областной клинической больницы и Витебского государственного медицинского университета, показано, что оценка динамики изменения концентрации сывороточного железа позволяет установить наступление смерти головного мозга у пациентов с черепно-мозговой травмой.

Заведующим лабораторией биохимии Республиканского научно-практического центра спорта (Минск) Акуличем Н.В. на основании приведенных им в статье «Значимость лактата эритроцитов в адаптации к гипоксии при проведении нагрузочного тестирования» результатов представлены новые аспекты толкования динамики уровня лактата в эритроцитах и капиллярной крови спортсменов под влиянием нагрузочных воздействий, что вносит существенный вклад в спортивную медицину.

По уже сложившейся традиции на страницах журнала нашли отражение результаты выполнения серии оригинальных исследований, проведенных специалистами из Ирака и касающихся осуществленной в эксперименте лабораторной оценки лечебного (фармакологического) влияния средств фитотерапии, получаемых из произрастающих в стране растений.

Надеемся, что представленный номер окажется востребованным как специалистами клинической лабораторной диагностики, так и врачами-клиницистами в их практической и научной деятельности.

Желаем всем читателям журнала «Лабораторная диагностика Восточная Европа» в новом, 2026 году крепкого здоровья, счастья и больших успехов в профессиональной и научной деятельности!

Главный редактор в Беларуси
Владимир Семенович Камышников



**Клиническая лабораторная эпидемиология /
Высокотехнологичные лабораторные исследования**
*Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В.,
Колтунова Ю.Б., Бельская И.В., Ковчур О.В.*
Молекулярные механизмы генетического
разнообразия норовирусов,
циркулировавших в Беларуси
в 2009–2024 гг. 545

**Клиническая микробиология /
Новые направления клинко-
лабораторных исследований**
Черновецкий М.А., Агеев Н.В., Гурбо Т.О.
Комплексный подход к лабораторной
диагностике инвазивных микозов
плесневой этиологии у детей с
онкогематологической патологией 559

**Клиническая микробиология /
Новые технологии
в лабораторной медицине**
*Осипкина О.В., Воропаев Е.В.,
Воропаева А.В., Валентович Л.Н.,
Рымко А.Н., Акалович С.Т., Ковалев А.А.*
Разработка и апробация метода
количественного определения ДНК
вирусов рода Alphatorquevirus 571

**Клиническая микробиология /
Оригинальные исследования**
Логинова О.П., Шевченко Н.И., Гасич Е.Л.
Состояние микробиоценоза влагалища
и оценка функциональной активности
резидентной микробиоты у женщин
при ВПЧ-негативной
цервикальной дисплазии 585

**Клиническая инфектология /
Новые технологии
в лабораторной медицине**
Лемеш А.В., Якубцевич Р.Э.
Лабораторные маркеры
клостридиальной инфекции
у пациентов с сепсисом 600

**Клиническая инфектология /
Высокотехнологичные лабораторные
исследования**
Лямцева А.К.
ПЦР-анализ в сочетании
с секвенированием для идентификации
гена 16S рРНК условно-патогенных
микроорганизмов при установлении
этиологии перипротезной инфекции
суставов 608

**Клиническая инфектология /
Молекулярно-генетические
исследования**
*Сергиенко Е.Н., Зверко В.В.,
Фомина Е.Г., Романова О.Н.*
Ассоциация полиморфизмов генов
иммунной системы с риском
и тяжестью сепсиса у детей 620

**Коронавирусная инфекция
и ее осложнения /
Высокотехнологичные лабораторные
исследования**
*Галиновская Н.В., Никифорова О.Л.,
Воропаев Е.В., Козлов А.Е.,
Осипкина О.В., Барбарович А.А.*
Значимость оценки параметров
системного воспаления и эндотелиальной
дисфункции у пациентов с состоянием
после инфекции COVID-19 629

**Спортивная медицина /
Технологии лабораторного
тестирования функциональных
резервов организма**
Акулич Н.В.
Значимость лактата
эритроцитов в адаптации
к гипоксии при проведении
нагрузочного тестирования 643

Передовые технологии лабораторных исследований / Инновации в лабораторной диагностике онкологических заболеваний

Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Пашкевич А.М., Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е., Субоч Е.И., Портянко А.С.
Возможности мониторинга уровня циркулирующей опухолевой ДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого с использованием маркера метилирования RASSF1 653

Клинико-лабораторная информатика / Оригинальные исследования

Липницкий А.Л.
Сывороточное железо как потенциальный маркер наступления смерти мозга у пациентов с черепно-мозговой травмой 660

Лабораторная оценка лечебного влияния средств фитотерапии / Микробиология и вирусология

Адиан Абд Альразак Дакл, Икрам Аббас Абуд Аль-Самрраи
Исследование роли этанолового экстракта листьев растения *Albizia lebbek* в качестве иммуномодулятора организма животных в ответ на заражение *Klebsiella pneumoniae* 669

Ахмед Ремтане Хуссейн, Манал Бади Салех, Сабах Хуссейн Энайя
Антибиопленочная и антибактериальная активность экстракта растения *Zygophyllum coccineum* (парнолистник алый) в отношении мультирезистентного *Staphylococcus aureus* 680

Нраван Мохаммед Вали, Альяа Хусейн Талиб, Худа Джихад Г. Аль-Шастри
Антибактериальная активность спиртового и водного экстрактов *Chlorella vulgaris* в отношении патогенных бактерий, выделенных у пациентов с диареей 691

Лабораторная оценка лечебного влияния средств фитотерапии / Оригинальные исследования

Мортада Эсам Садик, Мухсин С. Аль Мозиль, Эйша С. Абдулла
Влияние добавок экстракта гибискуса на функции тестикул и окислительный стресс у крыс, подвергшихся воздействию хлорпирифоса 701

Clinical Laboratory Epidemiology / High-tech Laboratory Research

*Paklonskaya N., Amvrosieva T.,
Koltunova Yu., Belskaya I., Kovchur O.*
Molecular Mechanisms
of Norovirus Genetic Diversity
in 2009–2024 in Belarus 546

Clinical Microbiology / New Directions in Clinical Laboratory Research

Tchernovetski M., Aheyev N., Gurbo T.
Integrated Approach to Laboratory
Diagnosis of Invasive Mycoses
of Mold Etiology in Children
with Oncohematological Pathology 561

Clinical Microbiology / New Technologies in Laboratory Medicine

*Osipkina O., Voropaev E., Voropaeva A.,
Valentovich L., Rymko A., Akalovich S.,
Kovalev A.*
Elaborating and Testing of a Quantification
Method for Alphatorquevirus
Genus Viruses DNA 573

Clinical Microbiology / Original Research

Lohinava V., Shevchenko N., Gasich E.
State of Vaginal Microbiocenosis and
Functional Activity of Resident Microbiota
Assessment in Women with HPV-Negative
Cervical Dysplasia 587

Clinical Infectology / New Technologies in Laboratory Medicine

Lemesh A., Yakubtsevich R.
Laboratory Markers of Clostridial Infection
in Patients with Sepsis 601

Clinical Infectology / High-tech Laboratory Research

Lyamtseva A.
PCR Analysis Combined with Sequencing
for Identifying the 16S rRNA Gene
of Opportunistic Microorganisms
in Establishing the Etiology
of Periprosthetic Joint Infection 609

Clinical Infectology / Molecular and Genetic Research

*Serhiyenka E., Zverko V.,
Fomina E., Romanova O.*
Association of Immune System Genes
Polymorphisms with Sepsis Risk
and Severity in Children 621

Coronavirus Infection and Its Complications / High-tech Laboratory Research

*Halinouskaya N., Nikiforova O.,
Voropaev E., Kazlou A.,
Osipkina O., Barbarovich A.*
Significance of Systemic Inflammation
and Endothelial Dysfunction
Parameters in Patients
with Post-COVID-19 Condition 630

Sports Medicine / Laboratory Testing Technologies for the Body's Functional Reserves

Akulich N.
Significance of Erythrocytes
Lactate in Adaptation to Hypoxia
during Load Testing 644

Advanced Laboratory Research Technologies / Innovations in Laboratory Diagnostics of Oncological Diseases

*Smirnou S., Miadzvedz A.,
Pashkevich A., Pivavarchyk S.,
Vakhomchyk T., Karatkevich P.,
Subach H., Portyanko A.*
Opportunities of Monitoring
Circulating Tumor DNA Levels
in Patients with Squamous
Cell Lung Cancer Using the RASSF1
Methylation Marker 654

Clinical Laboratory Informatics / Original Research

Lipnitski A.
Serum Iron as a Marker
of Brain Death in Patients
with Traumatic Brain Injury 661

Laboratory Assessment of the Therapeutic Effect of Herbal Remedies / Microbiology and Virology

*Adian Abd Alrazak Dakl,
Ikram Abbas Aboud Al-Samraee*
Study the Role of Ethanolic Leaves Extract of Albizia Lebbeck as an Immunomodulator in Response to Klebsiella Pneumoniae Infection in Animals 668

*Ahmed Remthane Hussein,
Manal Badi Saleh,
Sabah Hussain Enayah*
Anti-Biofilm and Antibacterial Activity of Zygophyllum Coccineum Extract Against Multidrug-Resistant Staphylococcus Aureus 679

*Nhrawaan Mohammed Wali,
Alyaa Hussein Talib,
Huda Jihad G. Al-Shastri*
Antibacterial Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of Chlorella Vulgaris Against Pathogenic Bacteria Isolated from Patients with Diarrhea 690

Laboratory Assessment of the Therapeutic Effect of Herbal Remedies / Original Research

*Mortada Esam Sadiq,
Muhsin S. AL Moziel, Asia S. Abdullah*
Impact of Hibiscus Extract Supplementation on Testicular Functions and Oxidative Stress in Rats Exposed to Chlorpyrifos 700



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.001>



Поклонская Н.В.✉, Амвросьева Т.В., Колтунова Ю.Б., Бельская И.В., Ковчур О.В.
Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
Минск, Беларусь

Молекулярные механизмы генетического разнообразия норовирусов, циркулировавших в Беларуси в 2009–2024 гг.

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Поклонская Н.В., Амвросьева Т.В. – существенный вклад в замысел и дизайн исследования, сбор данных или анализ и интерпретацию данных, подготовка статьи и ее критический пересмотр в части значимого интеллектуального содержания, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования; Колтунова Ю.Б., Бельская И.В., Ковчур О.В. – существенный вклад в замысел и дизайн исследования, сбор данных или анализ и интерпретацию данных.

Подана: 02.05.2025

Принята: 24.09.2025

Контакты: labsanvir@gmail.com

Резюме

Введение. Норовирусы – широко распространенные этиологические агенты острого гастроэнтерита и доминирующие возбудители групповой заболеваемости.

Цель. Установление генетического разнообразия норовирусов, циркулировавших в Беларуси с 2009 по 2024 г., и молекулярных механизмов его формирования.

Материалы и методы. В работе представлены результаты анализа нуклеотидных последовательностей норовирусов (n=500), содержащие фрагменты основного капсидного белка и РНК-полимеразы (504 нт). Молекулярное типирование последовательностей осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7.0.

Результаты. За период наблюдения идентифицировано 23 различных генотипа / рекомбинантные формы норовирусов. На территории страны доминировали генотипы основного капсидного белка VP1 норовирусов GII.4, GII.17, GII.2, GII.6, GII.3. Среди генов РНК-полимеразы преобладали GII.16, GII.4, GII.17, GII.31. Значительные различия в спектре доминировавших генов VP1 и РНК-полимеразы объяснялись циркуляцией большого количества рекомбинантных форм норовирусов. Наиболее часто встречались рекомбинантные формы GII.4[P16], GII.2[P16], GII.4[P31], GII.6[P7]. Генетический дрейф также вносил серьезный вклад в поддержание генетического разнообразия норовирусов. Различные геноварианты норовирусов были идентифицированы внутри генотипа GII.4 (GII.4 Den Haag, GII.4 New Orleans, GII.4 Sydney), рекомбинантной формы GII.6[P7] (GII.6a[P7] и GII.6b[P7]) и генотипа GII.17[P17] (GII.17[P17]a и GII.17[P17]b).

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что большое генетическое многообразие норовирусов, которым обеспечивается как генетический дрейф, так и рекомбинация, является основой широкого распространения этих патогенов. Для осуществления успешного контроля за заболеваемостью кишечными вирусными инфекциями и предотвращения вспышек и эпидемий норовирусной инфекции необходимо проведение регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга норовирусов.

Ключевые слова: норовирус, генетическое разнообразие, генотип, рекомбинация, генетический дрейф

Paklonskaya N.✉, Amvrosieva T., Koltunova Yu., Belskaya I., Kovchur O.
Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Molecular Mechanisms of Norovirus Genetic Diversity in 2009–2024 in Belarus

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, editing, material collecting, processing, text writing – Paklonskaya N.; study concept and design, editing, processing, text writing – Amvrosieva T.; editing, material collecting, text writing – Koltunova Yu.; editing, material collecting, text writing – Belskaya I.; editing, material collecting, text writing – Kovchur O.

Submitted: 02.05.2025

Accepted: 24.09.2025

Contacts: labsanvir@gmail.com

Abstract

Introduction. Noroviruses are widespread etiologic agents of acute gastroenteritis and the dominant causative agents of group morbidity.

Purpose. To establish the genetic diversity of noroviruses circulating in Belarus in 2009–2024 and the molecular mechanisms of its formation.

Materials and methods. The paper presents the results of the analysis of norovirus nucleotide sequences (n=500) containing fragments of the major capsid protein and RNA polymerase (504 nt). Molecular typing of sequences was performed using MEGA 7.0 software package.

Results. During the observation period, 23 different genotypes/recombinant forms of noroviruses were identified. The genotypes of the main capsid protein VP1 of noroviruses GII.4, GII.17, GII.2, GII.6, GII.3 dominated in the country. Among the RNA polymerase genes, GII.16, GII.4, GII.17, and GII.31 were predominant. Significant differences in the spectrum of dominant VP1 and RNA polymerase genes were explained by the circulation of a large number of recombinant forms of noroviruses. The most common recombinant forms were GII.4[P16], GII.2[P16], GII.4[P31], and GII.6[P7]. The genetic drift also made a significant contribution to maintaining the genetic diversity of noroviruses. Different genovariants of noroviruses were identified within the GII.4 genotype (GII.4 Den Haag, GII.4 New Orleans, GII.4 Sydney), the recombinant form GII.6[P7] (GII.6a[P7] and GII.6b[P7]) and the GII.17[P17] genotype (GII.17[P17]a, and GII.17[P17]b).

Conclusion. The results presented indicate that the high genetic diversity of noroviruses, which ensured both genetic drift and recombination, underlined the wide spread of these pathogens. Regular molecular epidemiological monitoring of noroviruses is required to ensure effective control of enteric viral infections and prevent norovirus infection outbreaks and epidemics.

Keywords: norovirus, genetic diversity, genotype, recombination, genetic drift



■ ВВЕДЕНИЕ

Впервые заболевание, характеризующееся внезапной рвотой и диареей и чаще встречающееся зимой, было описано в 1929 г. [1]. Много лет спустя было установлено, что его этиологическим агентом являются норовирусы (NoV) – РНК-содержащие мелкие безоболочечные вирусы, чрезвычайно широко распространенные в мире и, по современным оценкам, вызывающие до 50% глобально регистрируемых случаев острого гастроэнтерита (ОГЭ) [2]. NoV – доминирующие возбудители групповой заболеваемости, вспышек эпидемий и даже пандемий ОГЭ [3], сопровождающихся достаточно большим количеством смертей [2] и серьезными экономическими потерями [4].

NoV человека относятся к роду *Norovirus*, семейству *Caliciviridae*. Они являются основной причиной эпидемических и спорадических случаев ОГЭ во всем мире [5]. Геном NoV представлен +РНК приблизительно 7,5 кБ, содержащей три открытые рамки считывания (ОРС) [6]. ОРС1 кодирует полипротеин, который может быть расщеплен на шесть неструктурных белков, включая р48 [7], НТФазу [8], р22 [9], VPg [10], протеазу [11] и вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу [12]. ОРС2 и ОРС3 кодируют структурные белки – VP1 и VP2 [13]. Каждый капсид вирусной частицы состоит из 90 димеров VP1, содержащих домен оболочки и выступающий домен, который служит вирусным лигандом для связывания с антигенами гистогруппы крови хозяина (HBGAs), действуя как мембранный белок и выполняя роль рецептора для норовируса [14]. VP2 – это минорный структурный белок, который взаимодействует с внутренней поверхностью капсида. VP1 – основной структурный белок, отвечающий за взаимодействие с клетками хозяина и уклонение от иммунного ответа хозяина [15].

Большая генетическая вариабельность – естественный биологический механизм, который лежит в основе широкого распространения NoV. Проведенные ранее исследования показали, что уменьшение генетического разнообразия вирусов приводит к уменьшению приспособленности вирусной популяции к меняющимся условиям окружающей среды. Предполагается, что вирусы более приспособлены, если они в состоянии производить разнообразное потомство. За счет этого механизма происходит формирование новых антигенных вариантов вируса, определяющих умение ускользать от его распознавания иммунной системой и широко распространяться среди людей [15].

Известны два основных механизма, обеспечивающих генетическую вариабельность NoV. Первый из них – это генетический (антигенный) дрейф, который происходит в результате накопления в геноме точечных мутаций за счет большого количества ошибок, совершаемых РНК-полимеразой в процессе репликации вируса. Второй механизм – рекомбинация, в ходе которой при одновременном заражении клетки двумя различными генотипами вируса в процессе репликации происходит смена матрицы, и дочерние геномы представляют собой рекомбинантные формы, состоящие из частей, полученных от разных генотипов NoV [15].

Результаты исследований *in vitro* показали, что скорость мутаций норовирусной полимеразы составляет от 10^{-3} до 10^{-5} нуклеотидных замен/сайт и зависит от распространенности генотипа (геноварианта) вируса. Наиболее широко распространенные штаммы GII.4 имели в 5–36 раз более высокую скорость мутаций по сравнению с реже обнаруживаемыми [16].

Геном HoV содержит горячую точку рекомбинации на границе между ORC1 и ORC2, поэтому значительная часть циркулирующих вирусов представлена рекомбинантными формами. В связи с этим для описания циркулирующих вирусов используется система двойного типирования, включающая обозначение генотипа, к которому относятся структурные гены вируса, и обозначение генотипа, к которому принадлежит РНК-полимераза. Таким образом, рекомбинантные вирусы ORC1/ORC2 обозначаются числами, представляющими их типы капсида и полимеразы (например, GII.2[P16], GII.6[P7]) [17]. Появление различных преобладающих HoV может быть связано с изменениями в VP1-белке, что позволяет вирусам избегать иммунитета, выработанного против предыдущих инфекций. Однако в последние годы было показано, что изменения в неструктурных белках и рекомбинация также могут приводить к возникновению эволюционно более успешных вариантов HoV, которые способны вытеснить предыдущие и стать доминирующими возбудителями ОГЭ у людей.

В Республике Беларусь HoV вносят значительный вклад в формирование заболеваемости острыми кишечными инфекциями [18]. Они являются вторыми по значимости вирусными этиологическими агентами после ротавируса в формировании sporadic заболеваемости среди детей до 6 лет и вносят равный с ротавирусом вклад в заболеваемость ОГЭ у детей школьного возраста и взрослых. Среди возбудителей групповой заболеваемости HoV уверенно лидируют: за весь период наблюдения с 2009 по 2024 г. они вызвали 74% эпизодов групповой заболеваемости.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установление генетического разнообразия HoV, циркулировавших в Беларуси с 2009 по 2024 г., и молекулярных механизмов его формирования.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на основании анализа нуклеотидных последовательностей 500 HoV, которые были получены в ходе молекулярного мониторинга этих возбудителей в 2009–2024 гг. и содержали фрагменты основного капсидного белка и полимеразы HoV.

Выделение РНК HoV осуществляли с помощью наборов «Рибо-преп» («Ампли-Сенс», Россия) и «НК-экстра» (Беларусь) в соответствии с инструкцией по применению.

Для накопления фрагментов генома вируса с целью секвенирования использовали «5x АртМикс» («АртБиоТех», Беларусь), содержащий все необходимые компоненты для проведения ОТ-ПЦР в одной пробирке и комплекты праймеров, разработанных различными авторами [19, 20]. Постановку реакции проводили в соответствии с инструкцией по применению «5x АртМикс», температуру и время отжига праймеров устанавливали в соответствии с рекомендациями разработчиков праймеров.

Реакцию секвенирования осуществляли с помощью набора GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman coulter, США). Детекцию результатов проводили на приборе CEQ 8 000 (Beckman coulter, США). Молекулярное типирование выполняли с помощью программного продукта Norovirus Genotyping Tool Version 1.0, доступного для свободного использования в режиме онлайн [21], и BLAST, открытого для свободного использования [22].



Компьютерный анализ последовательностей осуществляли с помощью программного продукта MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 7.0 [23]. Референсные последовательности были получены из базы данных Genbank с использованием интернет-ресурса BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) [22]. Филогенетическую реконструкцию проводили методом максимального правдоподобия, статистическую достоверность топологии оценивали с помощью бутстрепинга (1000 псевдореplikатов).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

За весь период наблюдения в стране было идентифицировано 23 различных генотипа / рекомбинантные формы НоВ. На рис. 1 представлены спектр и частота их обнаружения по годам.

В течение анализируемого периода на территории страны регулярно происходила смена доминирующего генотипа / рекомбинантной формы НоВ. Исключением стали только годы пандемии COVID-19 и постпандемийный период (2020–2024 гг.): в это время наблюдались длительная циркуляция и преобладание нескольких генотипов – GII.4[P16], GII.2[P16], GII.17[P17], которые обнаруживались и доминировали в предшествующие годы.

В ходе наблюдения была зарегистрирована циркуляция НоВ, несущих гены VP1 15 генотипов (GII.1 – 1,6%, GII.2 – 14,1%, GII.3 – 8,0%, GII.4 – 41,4%, GII.6 – 10,7%, GII.7 – 0,8%, GII.8 – 0,2%, GII.12 – 3,0%, GII.13 – 0,2%, GII.17 – 17,9%, GI.1 – 0,2%, GI.2 – 0,2%, GI.3 – 1,4%, GI.5 – 0,2%, GIX.1 – 0,2%) и гены полимеразы 18 генотипов (GII.P2 – 0,4%, GII.P4 – 7,6%, GII.P7 – 10,8%, GII.P8 – 0,2%, GII.P12 – 2,0%, GII.P13 – 0,6%, GII.P14 – 0,8%, GII.P15 – 0,2%, GII.P16 – 47,2%, GII.P17 – 18,0%, GII.P21 – 0,8%, GII.P31 – 7,2%, GII.P33 – 2,0%, GI.P1 – 0,2%, GI.P2 – 0,2%, GI.P3 – 1,4%, GI.P5 – 0,2%). Частота выявления и спектр обнаруживаемых у циркулировавших НоВ генотипов капсидного белка и РНК-полимеразы имели существенные отличия, что можно объяснить циркуляцией различных рекомбинантных

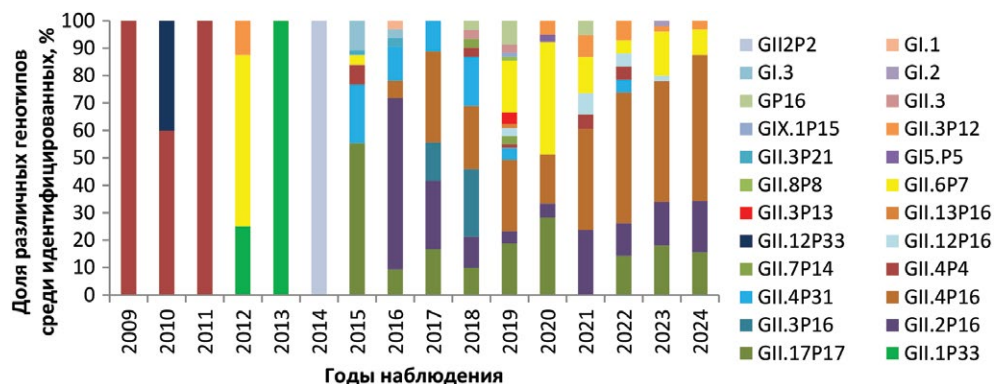
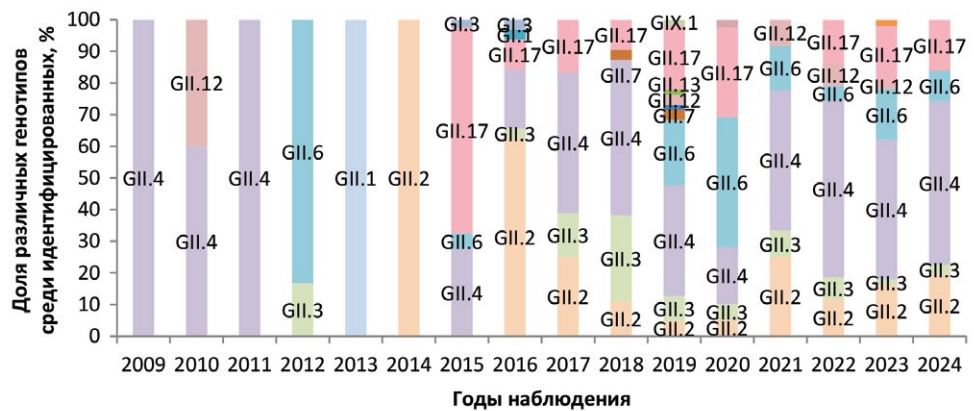


Рис. 1. Распределение генотипов и рекомбинантных форм норовирусов, идентифицированных в Беларуси с 2009 по 2024 г. (n=500)

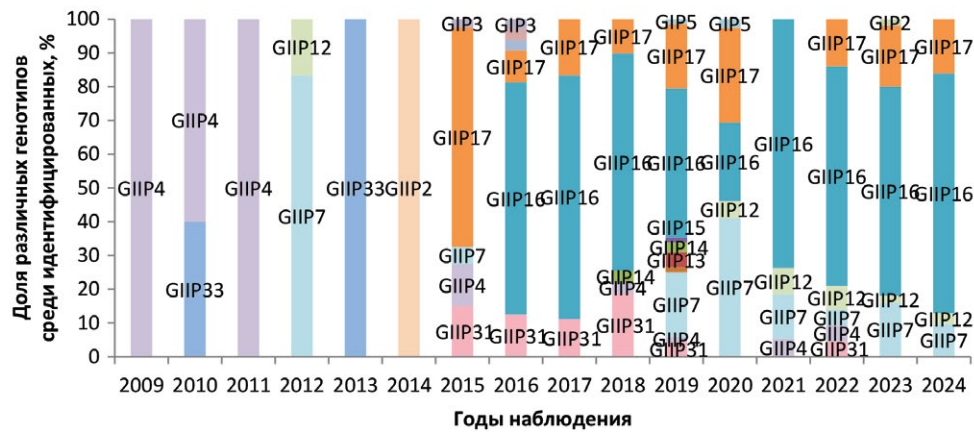
Fig. 1. Distribution of genotypes and recombinant forms of noroviruses identified in Belarus from 2009 to 2024 (n=500)

форм HoB. В результате анализа частоты выявления различных генотипов капсидного белка и РНК-полимеразы по годам установлено, что на протяжении всего периода наблюдения среди HoB преобладали гены VP1 (рис. 2А) и РНК-полимеразы (рис. 2В), которые относились к нескольким доминирующим генотипам. Долше всех циркулировали HoB, которые несли гены VP1 GII.4 (2009–2011, 2015–2024 гг.), GII.2 (2014, 2016–2024 гг.), GII.3 (2012, 2017–2024 гг.), GII.6 (2012, 2015, 2019–2024 гг.), GII.17 (2015–2024 гг.). Среди генов РНК-полимеразы преобладали GII.4 (2009–2011, 2015–2022 гг.), GII.16 (2016–2024 гг.), GII.17 (2015–2024 гг.), GII.31 (2015–2022 гг.).

Преобладавший среди циркулировавших HoB ген VP1 генотипа GII.4 был представлен несколькими эпидемическими геновариантами, которые, как было показано ранее [16], имели глобальное распространение. На территории Беларуси обнаружена циркуляция трех ранее идентифицированных глобальных геновариантов



А



В

Рис. 2. Частота встречаемости норовирусов, несущих ген VP1 (А) и РНК-полимеразы (В) разных генотипов, по годам
Fig. 2. Frequency of detecting noroviruses carrying the VP1 (A) and RNA polymerase (B) genes of different genotypes, by years



VP1 GII.4: Den Haag (2009–2010), New Orleans (2010–2012) и Sydney (2015–2024). Всего идентифицировано 200 HoB, которые несли ген основного капсидного белка этого генотипа. Среди них 9,0% [5,3%; 14,2%] принадлежали геноварианту Den Haag, 5,0% [2,4%; 9,2%] – геноварианту New Orleans и 86,0% [73,6%; 99,9%] – геноварианту Sydney ($p < 0,001$). На рис. 3 видно распределение частоты обнаружения различных геновариантов VP1 GII.4 по годам. Геноварианты Den Haag и New Orleans, циркулировавшие в Беларуси в 2009–2011 гг., не были рекомбинантными и сменили друг друга через два года после появления. В 2015 г. им на смену пришел геновариант VP1 GII.4 Sydney в составе двух рекомбинантных форм: GII.4 Sydney [P31], который имел РНК-полимеразу генотипа GII.P31, и GII.4 Sydney [P4 New Orleans], который нес РНК-полимеразу того же генотипа GII.4, но другого геноварианта (GII.P4 New Orleans). По результатам молекулярного типирования установлено, что эти две рекомбинантные формы циркулировали параллельно с 2015 по 2022 г. В 2016 г. появилась третья рекомбинантная форма HoB, содержащая ген VP1 GII.4 Sydney и РНК-полимеразу GII.P16. Эта рекомбинантная форма HoB стала доминирующей на протяжении следующих восьми лет вплоть до 2024 г. (рис. 3). HoB VP1 GII.4 Sydney, которые несли РНК-полимеразу GII.P16, в разные годы составляли от 17,9% до 53,1% идентифицированных HoB: содержащие РНК-полимеразу GII.P31 – от 4,4% до 21,4%, содержащие РНК-полимеразу GII.P4 New Orleans – от 1,5% до 7,1% генотипированных HoB. В целом частота обнаружения GII.4 Sydney [P16] составила 25,2% [21,0%; 30,0%] и была достоверно выше, чем GII.4 Sydney [P31] (7,2 % [5,0%; 10,0%]) и GII.4 Sydney [P4 New Orleans] (2,2% [1,1%; 3,9%]).

Ген РНК-полимеразы GII.P16, который вошел в состав доминирующего рекомбинантного геноварианта GII.4 Sydney [P16], обнаруживался также в составе других рекомбинантных форм HoB. Всего идентифицировано 224 HoB, которые несли ген РНК-полимеразы GII.P16. Они принадлежали пяти различным рекомбинантным формам: GII.2[P16] (30,8% [24,0%; 39,0%]), GII.3[P16] (9,0% [5,5%; 13,8%]), GII.4[P16] (56% [46,9%; 67,0%]), GII.12[P16] (3,6% [1,5%; 7,0%]) и GII.13[P16] (0,5% [0,01%; 2,5%]).

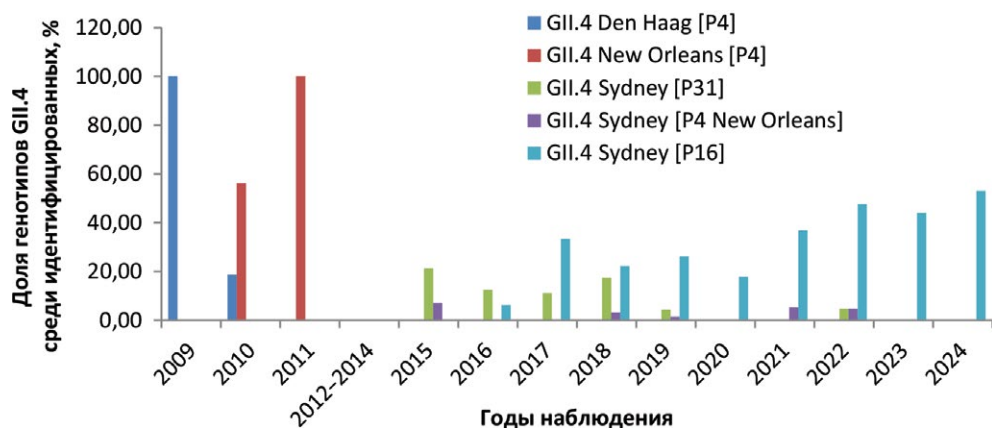


Рис. 3. Частота различных геновариантов и рекомбинантных форм норовирусов генотипа VP1 GII.4
Fig. 3. Frequency of different genovariants and recombinant forms of noroviruses of VP1 GII.4 genotype

В 2015 г. на территории Беларуси появился новый генотип – NoB GII.17[P17], который впоследствии получил чрезвычайно широкое распространение. Данный генотип продолжает циркулировать до настоящего времени и входит в число доминирующих генотипов NoB среди всех идентифицированных (18,0% [14,5%; 22,1%]). Результаты молекулярного типирования показали, что GII.17[P17] не является рекомбинантным – и РНК-полимераза, и капсидный белок принадлежат генотипу GII.17. Длительная циркуляция данного генотипа послужила основанием для предположения о возможности формирования внутри него различных геновариантов. Для подтверждения этого предположения был проведен филогенетический анализ (рис. 4). Установлено, что изоляты, циркулировавшие в разное время, достоверно формируют два различных кластера, один из которых включает NoB, идентифицированные

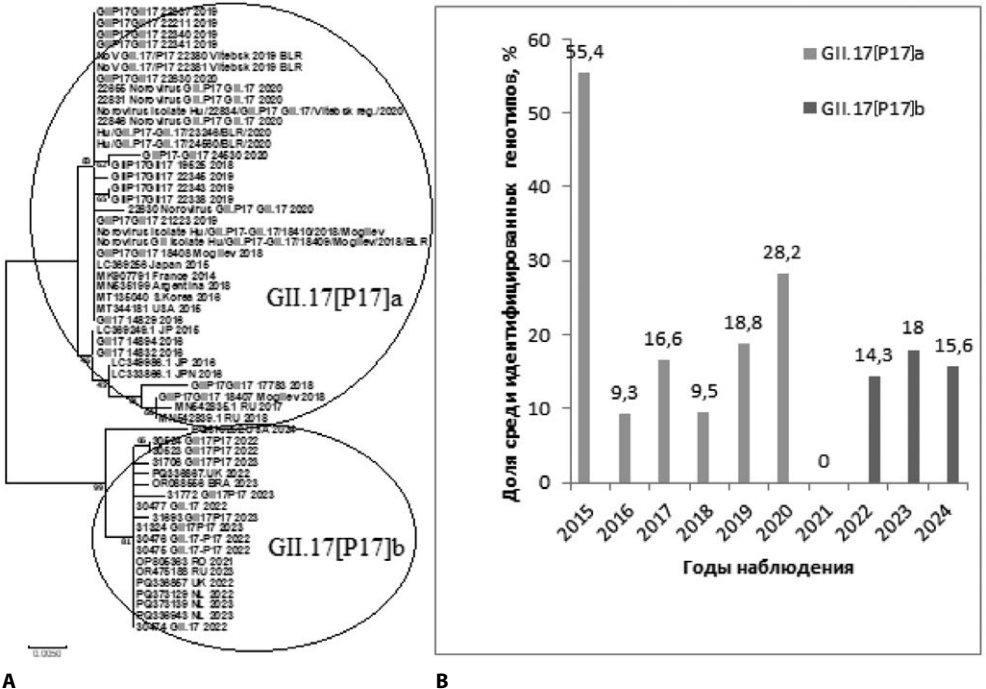


Рис. 4. Идентификация геновариантов GII.17[P17], циркулировавших в Беларуси, и их частота в различные годы: А – филогенетическая реконструкция по фрагменту генома норовирусов GII.17[P17], включающего участок 5'гена РНК-полимеразы и 3'гена основного капсидного белка (504 нуклеотида). Реконструкцию проводили методом максимального правдоподобия, для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовалось дискретное гамма-распределение: внизу слева – шкала генетического расстояния (нуклеотидных замен/сайт), в узлах дерева – значения бутстреппа; В – частота выявления геновариантов GII.17[P17]a и GII.17[P17]b в различные годы

Fig. 4. Identification of GII.17[P17] variants circulating in Belarus and their frequency in different years: А – phylogenetic reconstruction based on a fragment of the GII.17[P17] norovirus genome, including the 5' RNA-polymerase and the 3' major capsid protein genes (504 nucleotides). The reconstruction was performed using the maximum likelihood method; the discrete gamma distribution was used to model differences in the rate of evolution between sites; the genetic distance scale (nucleotide substitutions/site) is shown at the bottom left; bootstrap values are at tree nodes; В – detection frequency of GII.17[P17]a and GII.17[P17]b variants in different years



в 2015–2020 гг., а второй – НоВ, идентифицированные в 2022–2024 гг. (рис. 4А). Полученные результаты указывают на то, что после 2021 г., когда НоВ GII.17[P17] не выявлялись на территории страны, возник новый геновариант данного генотипа, с чем и было связано увеличение частоты его обнаружения в 2022–2024 гг. (рис. 4В).

Еще одним довольно широко распространенным и длительно циркулирующим в Беларуси рекомбинантным генотипом является НоВ GII.6[P7]. Впервые он был обнаружен в 2012 г., затем – в 2015 г. Данный генотип входил в число доминирующих в 2019–2020 гг. и продолжил циркулировать вплоть до 2024 г. Ранее было показано, что он циркулирует в виде трех геновариантов, которые возникли в результате генетического дрейфа гена VP1 – GII.6a[P7], GII.6b[P7], GII.6c[P7] [24]. Проведенный филогенетический анализ (рис. 5А) показал, что часть идентифицированных в Беларуси НоВ принадлежала геноварианту GII.6a[P7], а другие – геноварианту GII.6b[P7]. Геновариант GII.6c[P7] на территории страны не обнаруживался. Результаты выявления различных геновариантов на протяжении времени показали, что доминировавший в 2012 г. геновариант GII.6a[P7] в 2019 г. сменил геновариант GII.6b[P7], который стал доминирующим в 2020 г., а затем они циркулировали параллельно с преобладанием последнего (рис. 5В).

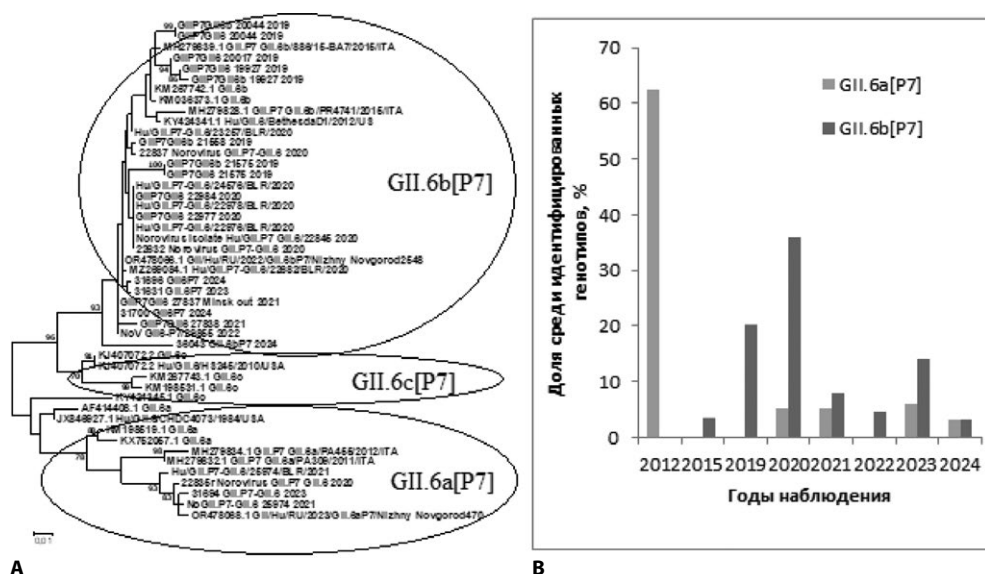


Рис. 5. Идентификация геновариантов GII.6[P7] в Беларуси и их частота в различные годы:
А – филогенетическая реконструкция по фрагменту генома норовирусов GII.6[P7], включающего участок 5'гена РНК-полимеразы и 3'гена основного капсидного белка (504 нуклеотида). Реконструкцию проводили методом максимального правдоподобия, для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовалось дискретное гамма-распределение: внизу слева – шкала генетического расстояния (нуклеотидных замен/сайт), в узлах дерева – значения бутстреппа; В – частота выявления геновариантов GII.6a[P7] и GII.6b[P7] в различные годы
Fig. 5. Identification of GII.6[P7] variants in Belarus and their frequency in different years:
А – phylogenetic reconstruction based on a fragment of the GII.6[P7] norovirus genome, including the 5' RNA-polymerase and the 3' major capsid protein genes (504 nucleotides). The reconstruction was performed using the maximum likelihood method; the discrete gamma distribution was used to model differences in the evolutionary rate between sites; the genetic distance scale (nucleotide substitutions/site) is shown at the bottom left; bootstrap values are shown at tree nodes; В – detection frequency of GII.6a[P7] and GII.6b[P7] variants in different years

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить, что за весь период наблюдения генетическое разнообразие циркулировавших на территории Беларуси HoB было довольно широко. Ежегодно обнаруживалась параллельная циркуляция нескольких генотипов / рекомбинантных форм HoB. Причем в 2009–2014 гг., когда генотипирование проводилось в отношении небольшого количества HoB (10–15 ежегодно), идентифицировались преимущественно самые распространенные генотипы / рекомбинантные формы. Начиная с 2015 г. ежегодно генотипировалось 35–60 HoB, что позволило обнаружить параллельную циркуляцию значительного количества генотипов / рекомбинантных форм. Максимальное количество одновременно циркулировавших генотипов HoB (13) было идентифицировано в 2019 г.

До начала пандемии COVID-19 в стране наблюдалась регулярная смена доминировавших генотипов в течение 1–3 лет. За этот период определенный генотип/геновариант/рекомбинант появлялся, становился преобладающим, а затем исчезал или обнаруживался реже (рис. 1). Однако с начала пандемии вплоть до настоящего времени наблюдалась длительная циркуляция одних и тех же генотипов / рекомбинантных форм HoB – GII.4[P16], GII.2[P16], GII.17[P17], GII.6[P7].

Анализ доминирующих среди HoB генов основного капсидного белка VP1 и РНК-полимеразы показал, что в течение всего периода наблюдения на территории страны имело место относительно небольшое количество преобладающих генотипов гена VP1: GII.4, GII.2, GII.3, GII.17, GII.6 – и еще меньшее количество широко распространенных генов полимеразы: GII.P4, GII.P31, GII.P16, GII.P17. Генетическое разнообразие циркулировавших HoB достигалось за счет образования множества различных рекомбинантных форм, включавших наиболее распространенные генотипы VP1 и РНК-полимеразы. Так, VP1 GII.4 встречался с тремя различными генотипами РНК-полимеразы: GII.P4, GII.P31, GII.P16. Генотип VP1 GII.3 образовывал различные рекомбинантные формы с генами полимеразы GII.P16, GII.P12, GII.P13, GII.P21. Генотип VP1 GII.2 входил в состав вируса с полимеразой того же генотипа – GII.P2, а также в состав рекомбинантной формы с полимеразой GII.P16. И, наоборот, аллель РНК-полимеразы GII.P16, по-видимому, давала значительные эволюционные преимущества ее носителю, и поэтому на территории страны обнаружена циркуляция пяти рекомбинантных форм, в состав которых она входила вместе с различными генами VP1: GII.2[P16], GII.3[P16], GII.4[P16], GII.12[P16], GII.13[P16]. Таким образом, исходя из представленных данных можно сделать вывод о том, что рекомбинация является одним из основных эволюционных механизмов, направленных на поддержание генетического многообразия циркулирующих в Беларуси HoB.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее распространенным за весь период наблюдения среди циркулировавших HoB был ген VP1 генотипа GII.4. Он был представлен тремя геновариантами: GII.4 Den Haag (2009–2010), GII.4 New Orleans (2010–2011), GII.4 Sydney (2016–2024), которые сменяли друг друга с течением времени. Ранее было показано, что данный генотип с середины 1990-х гг. являлся причиной большинства вспышек и спорадических случаев во всем мире [16, 25]. С 2002 г. новые геноварианты GII.4 появлялись каждые 2–3 года, что приводило к эпидемиям, а иногда и к пандемиям. Эволюция генотипа GII.4 была обусловлена как антигенным дрейфом, так и рекомбинацией [26]. Мутации ключевых эпитопов в домене P2 OPC2 позволили новым геновариантам избегать распознавания путем



нейтрализации антител, вырабатываемых ранее циркулирующими геновариантами GII.4 [27]. Внутригенотипическая и межгенотипическая рекомбинация, происходящая в первую очередь на стыке OPC1 – OPC2, но также внутри OPC2 и на стыке OPC2 – OPC3, являлась еще одним механизмом возникновения пандемических вариантов GII.4 [28]. Следует отметить, что эпидемические варианты GII.4, описанные в 1995–1996, 2002, 2004 и 2006 гг., формировались в основном посредством антигенного дрейфа, а варианты GII.4, описанные в 2009 и 2012 гг., возникли с участием рекомбинации.

В Беларуси в 2016–2022 гг. одновременно циркулировали три рекомбинантные формы HoV, которые несли VP1, принадлежащий к геноварианту GII.4 Sydney, и полимеразу трех различных генотипов: GII.P16, GII.P4, GII.P31. Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что из трех рекомбинантных форм HoV их представители, несущие ген полимеразы GII.P16, имели преимущество перед двумя другими рекомбинантными формами – они доминировали в течение всего периода параллельной циркуляции в 2016–2022 гг. Следует отметить, что геновариант GII.4 Sydney, который в составе рекомбинантной формы GII.4[P16] циркулирует в нашей стране с 2016 г. и является преобладающим, также в настоящее время доминирует в глобальном масштабе. Данный геновариант является единственным из всех изученных геновариантов VP1 GII.4, который не накапливает мутации в антигенных сайтах и продолжает циркулировать на протяжении десятилетия. Этот факт на сегодняшний день не имеет однозначного объяснения. С одной стороны, можно предположить, что ген полимеразы GII.P16, входящий в состав рекомбинантной формы с GII.4 Sydney, обеспечивает высокую трансмиссивность и поддерживает активную циркуляцию этого вируса, с другой – что случившаяся пандемия COVID-19 и связанные с ней жесткие ограничения на контакты и перемещения людей могли привести к значительному увеличению неиммунной прослойки восприимчивых лиц, что пролонгировало период циркуляции отдельных генотипов / рекомбинантных форм HoV.

Ген полимеразы GII.P16 был преобладающим среди HoV в течение всего периода наблюдения. Впервые он появился на территории страны в 2016 г. в составе рекомбинантной формы HoV GII.2[P16], которая сразу стала доминирующей [29]. Одновременно в 2016 г. в стране появилась рекомбинантная форма GII.4[P16], которая стала преобладающей в 2017 г. и продолжила циркуляцию вплоть до 2024 г. В мире появление новой аллели РНК-полимеразы GII.P16 впервые описано в 2015 г. Проведенные исследования показали, что она чрезвычайно широко распространилась в составе различных рекомбинантных форм, многие из которых были зарегистрированы и в нашей стране. На основании анализа нового варианта РНК-полимеразы предполагается, что аминокислотные изменения в этом белке привели к возникновению повышенной трансмиссивности рекомбинантных форм, несущих РНК-полимеразу GII.P16 [30].

В формирование генетического разнообразия HoV, помимо рекомбинации, значительный вклад вносил и генетический дрейф, который приводил к образованию новых геновариантов одного и того же генотипа, сменявших друг друга с течением времени или циркулировавших одновременно. Так, генотип GII.6P7 был представлен двумя геновариантами – GII.6aP7 и GII.6bP7, которые на первом этапе сменяли друг друга, а затем циркулировали параллельно с преобладанием GII.6bP7. Геновариант GII.6bP7 впервые появился в Беларуси в 2019 г. и вошел в тройку доминирующих,

а в 2020 г. стал самым распространенным среди всех циркулировавших NoB. В других странах самые ранние идентифицированные изоляты GII.6bP7 датировались 2010–2014 гг., тогда как GII.6aP7 – 1976 г. [31], что указывает на относительно недавнее появление и распространение геноварианта GII.6bP7 в глобальном масштабе.

Циркуляция генотипа GII.17 была описана еще в 1970-е гг., но характеризовалась очень ограниченным количеством случаев. Появившийся в 2015 г. и получивший широкое распространение генотип GII.17[P17] Kawasaki эволюционировал в 10 раз быстрее, чем доминирующий в глобальном масштабе генотип GII.4. Так, если скорость эволюции последнего была $4,3 \times 10^{-3}$ нуклеотидных замен/сайт/год, то скорость эволюции GII.17[P17] Kawasaki составила $1,2\text{--}2,1 \times 10^{-2}$ нуклеотидных замен/сайт/год [32]. В Беларуси этот генотип появился в конце 2015 г. и практически сразу стал доминирующим. Его циркуляция продлилась до 2020 г. включительно, прервалась в 2021 и возобновилась в 2022 г. Результаты филогенетического анализа свидетельствовали о том, что возобновление циркуляции GII.17[P17] было связано с появлением в нашей стране нового геноварианта данного генотипа. Этот геновариант впервые появился в Румынии в 2021 г. во время крупной вспышки норовирусного ОГЭ и впоследствии также распространился по ряду европейских стран, став доминирующим [33].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе результаты отражают значительное генетическое многообразие NoB, циркулировавших в Беларуси с 2009 по 2024 г. Всего в республике за период наблюдения идентифицировано 23 различных генотипа / рекомбинантные формы NoB.

На территории страны доминировали генотипы VP1 GII.4, GII.17, GII.2, GII.6, GII.3. Среди генов РНК-полимеразы преобладали GII.16, GII.4, GII.17, GII.31. Значительные различия в спектре доминировавших генов VP1 и РНК-полимеразы объяснялись циркуляцией большого количества рекомбинантных форм NoB, которые несли гены VP1 и РНК-полимеразы различных генотипов. Наиболее часто встречались рекомбинантные формы GII.4[P16], GII.2[P16], GII.4[P31], GII.6[P7].

Появление на территории страны нового генотипа гена РНК-полимеразы GII.P16 в составе рекомбинантной формы GII.4 Sydney [P16] и ее широкое распространение сопровождалось значительным снижением частоты обнаружения ранее циркулировавших рекомбинантных форм GII.4 Sydney [P4] и GII.4 Sydney [P31], которые несли тот же ген капсидного белка, что непосредственно указывает на роль гена РНК-полимеразы и процесса рекомбинации в формировании новых эпидемических форм NoB.

Генетический (антигенный) дрейф также вносил значительный вклад в поддержание большого генетического разнообразия NoB и формирование новых эпидемических геновариантов. Так, ген VP1 GII.4 был представлен тремя различными геновариантами (GII.4 Den Haag, GII.4 New Orleans, GII.4 Sydney), сменявшими друг друга с течением времени. Ген VP1 GII.6 в составе рекомбинантной формы GII.6[P7] также был представлен двумя различными геновариантами – GII.6a[P7] и GII.6b[P7], причем появление последнего привело к резкому повышению частоты его обнаружения у пациентов. Генотип GII.17[P17], который является одним из доминирующих на территории страны, также был представлен двумя геновариантами, сменившими друг друга в циркуляции. Геновариант GII.17[P17]а циркулировал с 2015 по 2020 г., а в 2022 г.



его сменил геновариант GII.17[P17]b, который продолжает циркулировать вплоть до настоящего времени.

Изложенные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что значительное генетическое многообразие НоВ, которое обеспечивается как генетическим (антигенным) дрейфом, так и рекомбинацией, является основой широкого распространения этих патогенов. Многие фундаментальные закономерности, приводящие к их появлению, смене и исчезновению, к настоящему времени еще не известны. В этих условиях сохраняется высокая актуальность осуществления регулярного молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркулирующих в стране НоВ и изучения их генетических характеристик, что является основой эффективного контроля за заболеваемостью кишечными вирусными инфекциями с целью своевременного предотвращения вспышек и эпидемий норовирусной инфекции.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zahorsk J. Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease. *Archives of pediatrics*. 1929;46:391.
2. Patel M., Widdowson M., Glass R., et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1224–1231. DOI: 10.3201/eid1408.071114
3. Estes M., Prasad B., Atmar R. Noroviruses everywhere: Has something changed? *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:467–474. DOI: 10.1097/01.qco.0000244053.69253.3d
4. Hoffmann S, Batz M., Morris J. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 2012;75:1292–1302. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-11-417.
5. Atmar R., Estes M. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14:15–37. DOI: 10.1128/CMR.14.1.15-37.2001
6. Pletneva M., Sosnovtsev S., Green K. The genome of Hawaii virus and its relationship with other members of the caliciviridae. *Virus Genes*. 2001;23:5–16. DOI: 10.1023/a:1011138125317
7. Ettayebi K., Hardy M. Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Virol*. 2003;77:11790–11797. DOI: 10.1128/jvi.77.21.11790-11797.2003
8. Yen J., Chen L., Wei L., et al. Identification and Characterization of Human Norovirus NTPase Regions Required for Lipid Droplet Localization, Cellular Apoptosis, and Interaction with the Viral P22 Protein. *Microbiol. Spectr*. 2021;9:e0042221. DOI: 10.1128/Spectrum.00422-21
9. Hardy M. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett*. 2005;253:1–8. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.08.031
10. Daughenbaugh K., Wobus C., Hardy M. VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells. *Virol. J*. 2006;3:33. DOI: 10.1186/1743-422X-3-33
11. Chang K., Takahashi D., Prakash O., et al. Characterization and inhibition of norovirus proteases of genogroups I and II using a fluorescence resonance energy transfer assay. *Virology*. 2012;423:125–133. DOI: 10.1016/j.virol.2011.12.002
12. Eden J., Sharpe L., White P., et al. Norovirus RNA-dependent RNA polymerase is phosphorylated by an important survival kinase. *Akt. J. Virol*. 2011;85:10894–10898. DOI: 10.1016/j.virol.2011.12.002
13. Prasad B., Hardy M., Dokland T., et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 1999;286:287–290. DOI: 10.1126/science.286.5438.287
14. Marionneau S., Ruvoën N., Le Moullac-Vaidye B., et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology*. 2002;122:1967–1977. DOI: 10.1053/gast.2002.33661
15. Omatola C.A., Mshelbwala P.P., Okolo M.O., et al. Noroviruses: Evolutionary Dynamics, Epidemiology, Pathogenesis, and Vaccine Advances-A Comprehensive Review. *Vaccines (Basel)*. 2024;12(6):590. DOI: 10.3390/vaccines12060590
16. Bull R., Eden J., Rawlinson W., et al. Rapid evolution of pandemic noroviruses of the GII.4 lineage. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000831. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000831
17. Chhabra P., de Graaf M., Parra G., et al. Updated Classification of Norovirus Genogroups and Genotypes. *J. Gen. Virol*. 2019;100:1393–1406. DOI: 10.1099/jgv.0.001318
18. Paklonskaya N.V., Amvrosyeva T.V., Kaltunova Yu.B., et al. Sporadic and group incidence of acute viral gastroenteritis in Belarus: spectrum of the pathogens and etiology features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2024;21(2):156–167. (In Russ.) DOI: 10.29235/1814-6023-2024-21-2-156-167
19. Kong B.H., Lee S.G., Han S.H., et al. Development of Enhanced Primer Sets for Detection of Norovirus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:103052. DOI: 10.1155/2015/103052
20. George S., Menon V., Ramani S., et al. Comparison of primers for the detection of genogroup II noroviruses in India. *Indian J Med Microbiol*. 2012;30(1):24–29. DOI: 10.4103/0255-0857.93016
21. Kroneman A., Vennema H., Deforche K., et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol*. 2011;51(2):121–125. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.03.006
22. Altschul S., Gish W., Miller W., et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
23. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
24. Chan-It W., Thongprachum A., Khamrin P., et al. Emergence of a new norovirus GII.6 variant in Japan, 2008–2009. *J Med Virol*. 2012;84(7):1089–1096. DOI: 10.1002/jmv.23309

25. Siebenga J., Vennema H., Zheng D.P., et al. Norovirus Illness Is a Global Problem: Emergence and Spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001–2007. *J Infect Dis.* 2009;200(5):802–812. DOI: 10.1086/605127
26. White P.A. Evolution of norovirus. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Aug;20(8):741–5. DOI: 10.1111/1469-0691.12746
27. Debbink K., Lindesmith L., Donaldson E., et al. Emergence of New Pandemic GII.4 Sydney Norovirus Strain Correlates with Escape from Herd Immunity. *J Infect Dis.* 2013;208(11):1877–1887. DOI: 10.1093/infdis/jit370
28. Eden J.S., Tanaka M.M., Boni M.F., et al. Recombination within the pandemic norovirus GII.4 lineage. *J Virol.* 2013;87(11):6270–6282. DOI: 10.1128/JVI.03464-12
29. Paklonskaya N., Amvrosieva T., Belskaya I., et al. Recombinant norovirus GII.P16 polymerase genotypes were predominant etiologic agents of acute gastroenteritis in Belarus in 2016–2021. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2021;4. DOI: 10.11134/btp.4.2021.3
30. Ruis C., Roy S., Brown J.R., et al. The emerging GII.P16-GII.4 Sydney 2012 norovirus lineage is circulating worldwide, arose by late-2014 and contains polymerase changes that may increase virus transmission. *PLoS One.* 2017;12(6):e0179572. DOI: 10.1371/journal.pone.0179572
31. Diakoudi G., Lanave G., Catella C., et al. Analysis of GII.P7 and GII.6 noroviruses circulating in Italy during 2011–2016 reveals a replacement of lineages and complex recombination history. *Infect Genet Evol.* 2019;75:103991. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103991
32. Chan M.C., Lee N., Hung T.N., et al. Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun.* 2015;6:10061. DOI: 10.1038/ncomms10061
33. Chhabra P., Wong S., Niendorf S., et al. Increased circulation of GII.17 noroviruses, six European countries and the United States, 2023 to 2024. *Euro Surveill.* 2024;29(39):2400625. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.39.2400625



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.002>
УДК 616.15-035.258:616.992]:616.15-006-053.2



Черновецкий М.А.✉, Агеев Н.В., Гурбо Т.О.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Комплексный подход к лабораторной диагностике инвазивных микозов плесневой этиологии у детей с онкогематологической патологией

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Черновецкий М.А. – методология, обобщение и анализ ретроспективных данных микробиологических исследований, подготовка статьи, библиография; Агеев Н.В. – проведение молекулярно-биологических исследований, подготовка дизайна статьи; Гурбо Т.О. – проведение микробиологических исследований (определение антимикочувствительности).

Подана: 02.05.2025

Принята: 17.09.2025

Контакты: m.tchernovetsky@yandex.by

Резюме

Введение. Среди огромного многообразия грибковых микроорганизмов (микромикет) особое внимание уделяется плесневой (мицелиальной, филаментозной) микробиоте, широко распространенной в окружающей среде и вызывающей тяжелые поражения поверхностных и внутренних органов и тканей у лиц с нарушениями иммунной системы. В первую очередь это относится к пациентам с различными формами онкогематологической патологии, реципиентам гемопоэтических стволовых клеток, пациентам с врожденными и приобретенными иммунодефицитными состояниями. Для указанных лиц жизненно важное значение имеет своевременная диагностика сопутствующих грибковых инфекций с идентификацией возбудителя, определением его чувствительности к антигрибковым лекарственным препаратам (антимикотикам) и назначением адекватной противогрибковой терапии.

Цель. Изучение этиологической структуры и антимикотикочувствительности плесневых грибов, выделенных у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (далее – Центр). Демонстрация возможности практического применения комплексного подхода к диагностике инвазивных плесневых микозов с использованием классических микробиологических и современных молекулярно-генетических методов исследований.

Материалы и методы. В качестве исследуемого материала при проведении лабораторных исследований использовались различные образцы биологического материала из клинически значимых локусов (кровь, содержимое дыхательных путей и органов дыхания, биоптаты легкого, моча), полученные от детей с онкогематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Центре с января 2002 г. по декабрь 2024 г. Использованные при работе методы диагностики включали в себя микробиологический посев биологического материала с последующим инкубированием в термостате; окраску (с последующей световой и люминесцентной микроскопией) мазков нативного биоматериала и выросших на твердых питательных средах

Сабуро и Чапека – Докса изолированных колоний плесневых микромицет; фенотипическую оценку условий, характера роста, цвета, структуры и текстуры выросшей микробиоты; масс-спектрометрический анализ белковой структуры выделенных колоний плесневых грибов; выявление методом иммуноферментного анализа галактоманнана в биологических жидкостях в виде сыворотки крови, содержимого бронхоальвеолярного лаважа и трахеобронхиального дренажа.

Результаты. Выявлены 123 штамма плесневых микромицет, относящихся к 14 родам и 22 видам. Наиболее часто обнаруживались представители родов *Aspergillus* и *Fusarium*. В свою очередь, среди аспергилл преобладали *Aspergillus fumigatus* (52,46%; 32 из 61 штамма), *Aspergillus flavus* (22,95%; 14 из 61 штамма) и *Aspergillus niger* (11,48%; 7 из 61 штамма), а среди фузарий – *Fusarium solani* в крови (41,18%; 7 из 17 штаммов) и *Fusarium oxysporum* в моче (31,25%; 5 из 16 штаммов). С учетом анализа этиологического состава выделенной филаментозной микробиоты была разработана и применена технология мультиплексной молекулярно-генетической идентификации микромицет методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Необходимо отметить, что видовая идентификация выделенной плесневой микрофлоры проведена с помощью комплексного использования фенотипических и молекулярно-генетических методов диагностики. Для определения чувствительности микромицет применялся градиентно-диффузный метод в варианте E-test. Оценка чувствительности выявленных штаммов плесневых грибов к противогрибковым препаратам проводилась на основании имеющихся критериев EUCAST. Согласно полученным результатам, наибольшая чувствительность штаммов *Aspergillus fumigatus* была выявлена к применению вориконазола – 86,67% (13 из 15 исследованных культур).

Заключение. На фоне общего преобладания аспергилл среди плесневых микроорганизмов, выявленных в различных видах биологического материала, отмечается обнаружение возбудителей так называемых редких микозов в виде *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia* spp. Основным видом среди выделенных аспергилл является *Aspergillus fumigatus*, проявляющий наибольшую чувствительность к вориконазолу. Существующие в настоящее время лабораторные технологии позволяют проводить комплексную лабораторную диагностику инвазивных микозов плесневой этиологии, включая проведение фенотипических, масс-спектрометрических и молекулярно-генетических исследований в сочетании с выявлением биологических маркеров и определением антимикотико-чувствительности выделенных микромицет.

Ключевые слова: инвазивные микозы, онкогематология, дети, микромицеты, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени



Tchernovetski M.✉, Aheyeu N., Gurbo T.

Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Integrated Approach to Laboratory Diagnosis of Invasive Mycoses of Mold Etiology in Children with Oncohematological Pathology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tchernovetski M. – methodology, generalization and analysis of microbiological tests data, text writing, bibliography; Aheyeu N. – molecular and biology tests, study design; Gurbo T. – microbiological tests (antifungal susceptibility testing).

Submitted: 02.05.2025

Accepted: 17.09.2025

Contacts: m.tchernovetsky@yandex.by

Abstract

Introduction. Among the huge variety of fungal microorganisms (micromycetes), special attention is paid to the mold (mycelial, filamentous) microbiota, widely spread in the environment and causing severe lesions of superficial and internal organs and tissues in persons with immune system disorders. This primarily applies to patients with various forms of oncohematological pathology, recipients of hematopoietic stem cells, and patients with congenital and acquired immunodeficiency conditions. For these subjects, timely diagnosis of concomitant fungal infections with identification of the causative agent, determining its sensitivity to antifungal drugs (antimycotics), and prescribing adequate antifungal and effective therapy are vital.

Purpose. To investigate of the etiological structure and antisensitivity of mold fungi isolated from children with oncological and hematological diseases treated in the Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology (hereinafter referred to as the Center). To demonstrate opportunities for practical application of an integrated approach to the diagnosis of invasive mold mycoses using both conventional microbiological and modern molecular genetic research methods.

Materials and methods. The so-called gold standard of microbiological diagnosis of infectious pathology is the isolation of the causative agent with its subsequent identification. Various samples of biological material of clinically significant loci (blood, contents of respiratory tract and respiratory organs, lung biopsy specimens, urine) obtained from children with oncohematological diseases treated in the Center from January 2002 to December 2024 were used as the study material for these laboratory tests. This time period was chosen for the study due to the introduction of a highly efficient automated culturing system into the practice of the Center in 2002. The diagnostic methods used in the work included microbiological seeding of biomaterial with subsequent incubation in thermostat; staining (with subsequent light and luminescent microscopy) of smears of native biomaterial and isolated colonies of mold microfungi grown on Sabouraud and Chapek – Dox solid nutrient media; phenotyping of conditions, growth pattern, color, structure and texture of the grown microbiota; mass-spectrometric and protein structure

of isolated colonies of mold fungi; molecular genetic detection of specific parts of the genome of micromycetes; detection of galactomannan in biological fluids as blood serum, bronchoalveolar lavage and tracheobronchial drainage by enzyme immunoassay.

Results. A total of 123 strains of mold micromycetes belonging to 14 genera and 22 species were identified. Representatives of genus *Aspergillus* and *Fusarium* were most frequently detected. *Aspergillus fumigatus* (52.46%; 32 of 61 strains), *Aspergillus flavus* (22.95%; 14 of 61 strains) and *Aspergillus niger* (11.48%; 7 of 61 strains) prevailed among *Aspergillus*. In turn, *Fusarium solani* dominated in blood (41.18%; 7 of 17 strains) and *Fusarium oxysporum* dominated in urine (31.25%; 5 of 16 strains). Taking into account the analysis of etiological composition of the isolated filamentous microbiota, a technology of multiplex molecular genetic identification of micromycetes by real-time polymerase chain reaction was worked out and applied. It should be noted that species identification of the isolated mold fungal was carried out using a comprehensive approach involving phenotypic and molecular genetic diagnostic methods. To determine the sensitivity of micromycetes, the gradient-diffusion method in E-test variant was used. The susceptibility of the identified mold strains to antifungal agents was assessed using existing EUCAST criteria. According to the results obtained, the highest susceptibility of *Aspergillus fumigatus* strains to voriconazole was found to be 86.67% (13 of 15 cultures tested).

Conclusion. Against the backdrop of the general prevalence of aspergillus among mold microorganisms identified in various types of biological material, the detection of pathogens of so-called "rare" mycoses in the form of *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., and *Lichtheimia* spp. is reported. *Aspergillus fumigatus*, which has the highest sensitivity to voriconazole, is the main species among the isolated aspergillus. Current laboratory technologies allow comprehensive laboratory diagnosis of invasive mycoses of mold etiology, including phenotyping, mass spectrometric, and molecular genetic tests in combination with biological markers identification and determination of antifungal sensitivity of isolated micromycetes.

Keywords: invasive mycoses, oncohematology, children, micromycetes, real-time polymerase chain reaction

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на общее превалирование дрожжевой микрофлоры в структуре возбудителей инвазивных микозов у детей с онкогематологической патологией, немаловажная роль в развитии инфекционных осложнений грибковой этиологии принадлежит представителям плесневой микрофлоры и в первую очередь – микромицетам рода *Aspergillus* [1–3]. В то же время в последние годы увеличивается количество случаев так называемых редких сопутствующих грибковых инфекций, вызванных грибами, таксономически относящихся к *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Lichtheimia* spp., *Alternaria* spp., *Geotrichum* spp. [4–7]. Инвазивные микозы, вызываемые мицелиальной микрофлорой, часто носят диссеминированный характер с тяжелым клиническим течением и высоким уровнем летальности. Особую опасность создает сочетанное инфицирование несколькими плесневыми микроорганизмами [8–10]. Присоединение сопутствующей грибковой инфекции в клинически тяжелых случаях приводит к необходимости коррекции лечения основной



онкогематологической патологии, вплоть до его временного прекращения. Одновременно возникает потребность в проведении специфической противогрибковой терапии, вызывающей дополнительную лекарственную нагрузку на организм иммуносупрессивных пациентов. В то же время, несмотря на клиническую значимость сопутствующей грибковой мицелиальной инфекции, в подавляющем большинстве микробиологических лабораторий медицинских учреждений соматического и инфекционного профиля нашей страны лабораторная идентификация возбудителей филаментозных инвазивных микозов осуществляется до уровня «плесневые грибы» без последующей родовой и/или видовой идентификации, а также без определения чувствительности к противогрибковым лекарственным средствам. В результате подобного подхода противогрибковая терапия проводится эмпирическим путем с риском развития неблагоприятных клинических последствий, вплоть до летального исхода. В свою очередь, проведение комплексной диагностики инвазивных плесневых микозов с микробиологическим выделением возбудителей, последующей родовой и видовой идентификацией, определением антимикотикочувствительности микромицет дает возможность своевременно установить этиологию сопутствующей инфекционной патологии и назначить адекватную противогрибковую терапию.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение этиологической структуры и антимикотикорезистентности плесневых грибов, выделенных у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (далее – Центр). Выявление антимикотикочувствительности основных плесневых микромицет, выделенных из клинически значимого биологического материала на основании определения минимальных ингибирующих концентраций противогрибковых лекарственных средств. Демонстрация возможности практического применения комплексного подхода к диагностике инвазивных плесневых микозов с использованием классических микробиологических и современных молекулярно-генетических методов исследований.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

«Золотым стандартом» микробиологической диагностики инфекционной патологии является выделение возбудителя с последующей его идентификацией. В качестве исследуемого материала при проведении данных лабораторных исследований использовались различные образцы биологического материала клинически значимых локусов (кровь, содержимое дыхательных путей и органов дыхания, биоптаты легкого, моча), полученные от детей с онкогематологическими заболеваниями, находившихся на лечении в Центре с января 2002 г. по декабрь 2024 г. Выбор для проведения исследований данного периода времени обусловлен внедрением в 2002 г. в практику работы учреждения высокоэффективной автоматизированной системы культивирования биологических материалов. Примененные при работе методы диагностики включали в себя микробиологический посев биоматериала с последующим инкубированием в термостате; окраску (с последующей световой и люминесцентной микроскопией) мазков нативного биоматериала и выросших на твердых питательных средах Сабуро и Чапека – Докса изолированных колоний плесневых микромицет; фенотипическую оценку условий, характера роста, цвета, структуры и текстуры

выросшей микрофлоры; масс-спектрометрический анализ белковой структуры выделенных колоний грибковой микробиоты; проведение молекулярно-генетической детекции специфических участков генома микромицет; выявление галактоманнана в сыворотке крови, содержанием бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и трахеобронхиального дренажа (ТБД) при помощи иммуноферментного анализа.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты выявления возбудителей плесневых микозов в различных видах биологического материала, полученного от детей с онкогематологической патологией, приведены в табл. 1.

Таблица 1
Этиологическая структура выделенных плесневых грибов
Table 1
Etiological structure of the isolated mold fungi

№ п/п	Наименование микромицет	Виды биоматериала за период 01.01.2002 – 31.12.2024					
		Кровь		БАЛ и ТБД, биоптаты легкого		Моча, ≥1000 КОЕ/мл	
		К-во	%	К-во	%	К-во	%
1	Aspergillus fumigatus	–	0,00	32	35,56	–	0,00
2	Aspergillus flavus	–	0,00	14	15,56	–	0,00
3	Aspergillus niger	–	0,00	7	7,78	–	0,00
4	Aspergillus ochraceus	–	0,00	1	1,11	–	0,00
5	Aspergillus sydowii	–	0,00	2	2,22	–	0,00
6	Aspergillus nidulans	–	0,00	1	1,11	–	0,00
7	Aspergillus spp.	–	0,00	4	4,45	–	0,00
8	Fusarium solani	7	41,17	–	0,00	3	18,75
9	Fusarium oxysporum	–	0,00	–	0,00	5	31,25
10	Fusarium proliferatum	–	0,00	–	0,00	1	6,25
11	Fusarium dimerum	2	11,77	–	0,00	1	6,25
12	Fusarium chlamydosporum	–	0,00	–	0,00	1	6,25
13	Fusarium spp.	–	0,00	–	0,00	1	6,25
14	Penicillium spp.	–	0,00	5	5,56	2	12,50
15	Mucor spp.	1	5,88	6	6,67	1	6,25
16	Rhizopus microsporus	–	0,00	2	2,22	–	0,00
17	Rhizopus arrhizus	–	0,00	2	2,22	–	0,00
18	Rhizopus spp.	1	5,88	1	1,11	–	0,00
19	Rhizomucor pusillus	–	0,00	1	1,11	–	0,00
20	Lichtheimia corymbifera	–	0,00	1	1,11	–	0,00
21	Epidermophyton spp.	1	5,88	–	0,00	–	0,00
22	Geotrichum capitatum	2	11,77	–	0,00	–	0,00
23	Geotrichum candidum	–	0,00	1	1,11	–	0,00
24	Geotrichum clavatum	1	5,88	–	0,00	–	0,00
25	Trichophyton spp.	–	0,00	1	1,11	–	0,00
26	Paecilomyces variotii	–	0,00	3	3,33	–	0,00
27	Purpureocillium liliacinum	–	0,00	1	1,11	–	0,00
28	Scedosporum apiospermum	–	0,00	1	1,11	–	0,00
29	Scedosporum spp.	–	0,00	1	1,11	–	0,00
30	Alternaria alternata	–	0,00	–	0,00	1	6,25
31	Недифференцированная плесень	2	11,77	3	3,33	–	0,00
ВСЕГО		17	100,00	90	100,00	16	100,00



При анализе приведенной в табл. 1 информации обращает на себя внимание превалирование представителей рода *Fusarium* среди микромицет, выделенных из периферической крови (67,78%; 9 из 17 штаммов – 52,94%) и мочи (75,0%; 12 из 16 штаммов). При этом необходимо отметить полное отсутствие фузарий в содержимом дыхательных путей и биоптатах легкого. Можно предположить, что у обследованных лиц преобладало диссеминированное поражение возбудителями фузариоза мочевыделительной системы и системы кровоснабжения. Среди филаментозных грибов, выделенных из органов дыхательной системы (БАЛ, ТБД, биоптаты легкого), наиболее часто обнаруживались аспергиллы (67,78%; 61 из 90 культур) с ожидаемым превалированием среди них *Aspergillus fumigatus* (52,46%; 32 из 61 штамма). Инфицированность возбудителями аспергиллеза была подтверждена у части детей с сопутствующими инфекционными заболеваниями на фоне основной онкогематологической патологии при помощи иммуноферментного метода диагностики биологического маркера – галактоманнана в сыворотке крови и содержимом дыхательных путей. Информация, изложенная в табл. 1, указывает и на обнаружение возбудителей так называемых редких инвазивных грибковых заболеваний (фузарий, мукоморомицет, геотрихий) в различных видах исследованного биоматериала. С учетом наличия в Центре банка выделенных микромицет и внедрения в 2017 г. в практику работы метода масс-спектрометрии в варианте матрикс-ассоциированной лазерной детекции/ионизации с задержкой во времени (MALDI-TOF MS) подавляющее большинство детектированных плесневых микромицет удалось ретроспективно дифференцировать до вида. Так, среди представителей *Fusarium* были выявлены *Fusarium solani*, *Fusarium dimerum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium chlamydosporum*. Среди представителей семейства *Mucoraceae* идентифицированы *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Lichtheimia corymbifera*. Возбудители геотрихоза представлены в виде *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum candidum* и *Geotrichum clavatum*.

Проведение классического микробиологического посева на твердые и в жидкие питательные среды различных образцов биологического материала, полученного из преимущественно клинически значимых локусов организма человека, является на сегодняшний день одним из тех основных методов лабораторной диагностики инвазивных микозов, что применяются в лабораториях медучреждений инфекционного и соматического профиля. Наиболее информативным является выделение микромицет из крови, ликвора и других биологических жидкостей, полученных из стерильных локусов (содержимое брюшной полости, жидкость крупных суставов). С этой целью эффективно использовались автоматизированные системы гемокультивирования типа BACT/ALERT и BACTEC, базирующиеся на колориметрической регистрации изменения окраски сенсора или измерения уровня флуоресценции, регистрируемых при выделении углекислого газа в ходе роста микрофлоры в соответствующих гемофлаконах. При этом большое значение имеет длительность культивирования флаконов с биологическим материалом. С учетом наличия медленно растущих видов плесневых микромицет период времени от внесения биоматериала до индикации в гемокультиваторе роста мицелиальной микрофлоры составлял до 14 суток. В свою очередь биологический материал из бронхоальвеолярных структур и биоптатов легкого, а также из мочи вносился в чашки Петри или пробирки с твердой либо жидкой питательной средой Сабуро с антибиотиком соответственно. Необходимо отметить, что среда Сабуро позволила при первичном посеве получить

эффективный рост плесневых микромицет. При этом для формирования типичного роста плесневой микрофлоры (в особенности представителей рода *Aspergillus*) и последующей ее идентификации (на основании визуального анализа образующихся при спороношении конидий и конидиальных структур) использовалась среда Чапека – Докса.

С учетом наличия природной либо приобретенной резистентности некоторых видов грибковой микрофлоры к отдельным видам антимикотиков в случае получения первичного роста микромицет целесообразно продолжить (при наличии возможности лаборатории) их исследование с целью проведения родовой и видовой идентификации. К сожалению, к настоящему времени отсутствуют диагностические панели, позволяющие проводить в автоматическом режиме идентификацию плесневых грибов при помощи микробиологических анализаторов типа Vitek 2 Compact и Phoenix. В связи с этим наиболее доступным подходом к родовой и видовой индикации и идентификации плесневой микрофлоры является анализ внешнего вида, условий и характера роста грибов, а также проведение световой и люминесцентной микроскопии изолированных колоний микромицет на стадии начального спороношения при росте на специализированных агаризованных питательных средах. Также эффективно применяются и современные методы индикации и идентификации возбудителей инвазивных плесневых микозов, базирующиеся на масс-спектрометрии структурных компонентов микромицет и на детекции специфических фрагментов ДНК грибов. В первую очередь это относится к анализу белковых структур в варианте MALDI-TOF MS [11]. Указанный метод позволяет провести исследование изолированных грибковых колоний в течение нескольких минут с учетом использования обширной номенклатуры микроорганизмов, входящих в базу данных автоматических масс-спектрометров типа Vitek MS и Bruker. На фоне интенсивного развития и внедрения в практическое здравоохранение молекулярно-биологических технологий в микробиологических лабораториях все шире применяется индикация возбудителей филаментозных грибковых инфекций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в варианте так называемого реального времени [12, 13]. Как правило, используются коммерческие тест-системы для выявления отдельных, наиболее актуальных видов микромицет рода *Aspergillus*. В последнее время проводятся активные исследования в области разработки мультипраймерных ПЦР-технологий, направленных на одновременное выявление в исследуемых образцах биологического материала сразу нескольких плесневых микромицет, относящихся к различным таксономическим группам. Применение подобного диагностического подхода позволяет расширить диапазон выявляемых и идентифицируемых возбудителей микозов, а также своевременно назначить целенаправленное противогрибковое лечение вместо эмпирической антимикотикотерапии.

В части индикации и идентификации плесневой микрофлоры в нативном биологическом материале применение ПЦР в режиме реального времени является, наряду с MALDI-TOF MS, не только эффективным, но и полностью объективным методом диагностики мицелиальных инвазивных микозов. Следует также остановиться на использовании методов определения уровней биологических маркеров в качестве «некультурального» подхода к диагностике плесневых грибковых инфекций. К настоящему времени имеется опыт практического использования тест-систем для выявления в крови и содержимом дыхательной системы специфических белков микромицет



в виде галактоманнана, маннана и 1-3-бета-D-глюкана [14]. В случае диагностики заболеваний, вызванных плесневой микрофлорой, используются диагностикумы для определения уровней галактоманнана и 1-3-бета-D-глюкана. К сожалению, данные реагенты не позволяют детектировать весь спектр возбудителей плесневых микозов (в частности, мукормикозов) и в ряде случаев дают ложноположительные и ложноотрицательные результаты (табл. 2).

В рамках выполнения научно-исследовательской работы в Центре на основе эталонных нуклеотидных последовательностей микромицет из базы данных GenBox сконструирована мультипраймерная технология выявления плесневых грибов, в основе которой лежит проведение этиологического анализа грибковых микроорганизмов, циркулирующих в конкретном стационаре. С учетом обнаруженной частоты выделения мицелиарной микробиоты у детей с инфекционными осложнениями на фоне основной онкогематологической патологии проводится двухэтапная ПЦР в режиме реального времени с первоначальной детекцией микромицет на уровне рода (либо семейства для мукоромицет) и последующей их идентификацией на уровне вида (рис. 1–3).

В качестве исследуемого материала при проведении мультипраймерных молекулярно-генетических исследований методом ПЦР в режиме реального времени использовались выделенные культуры микромицет и нативный биологический материал.

Одним из значимых этапов комплексной лабораторной диагностики инвазивных микозов плесневой этиологии является определение чувствительности плесневых

Таблица 2
Основные виды микромицет, детектируемые при помощи определения уровней биологических маркеров
Table 2
Main types of micromycetes detected by determining biological markers levels

Наименование биологического маркера	Наименование детектируемых микромицет
Галактоманнан (Galactomannan)	Aspergillus spp., Penicillium spp., Geotrichium spp., Fusarium spp., Cryptococcus spp.
1-3-бета-D-глюкан (1-3-betta-D-glucan)	Candida spp., Aspergillus spp., Fusarium spp., Trichosporon spp., Saccharomyces cerevisiae, Pneumocystis jirovecchi

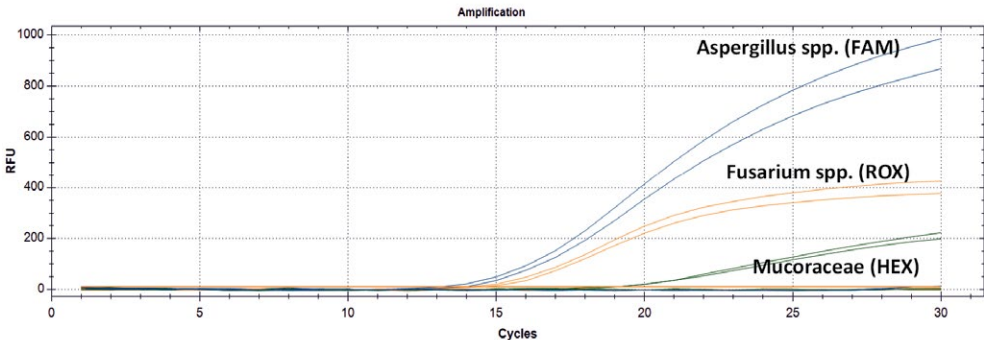


Рис. 1. Детекция плесневых микромицет
Fig. 1. Species-specific PCR detection of mold fungi

микромицет к противогрибковым лекарственным средствам на основе определения минимальных ингибирующих концентраций антимикотиков (МИК). В настоящее время лишь единичные лаборатории проводят подобные исследования в Республике Беларусь. В части методологии определения резистентности мицелиальной грибковой микрофлоры оптимальным диагностическим подходом (с учетом затрат времени на выполнение исследования и получение результата в виде минимальной ингибирующей концентрации используемого антимикотика) является градиентно-диффузный метод анализа с использованием тест-полосок (типа Е-тестов)

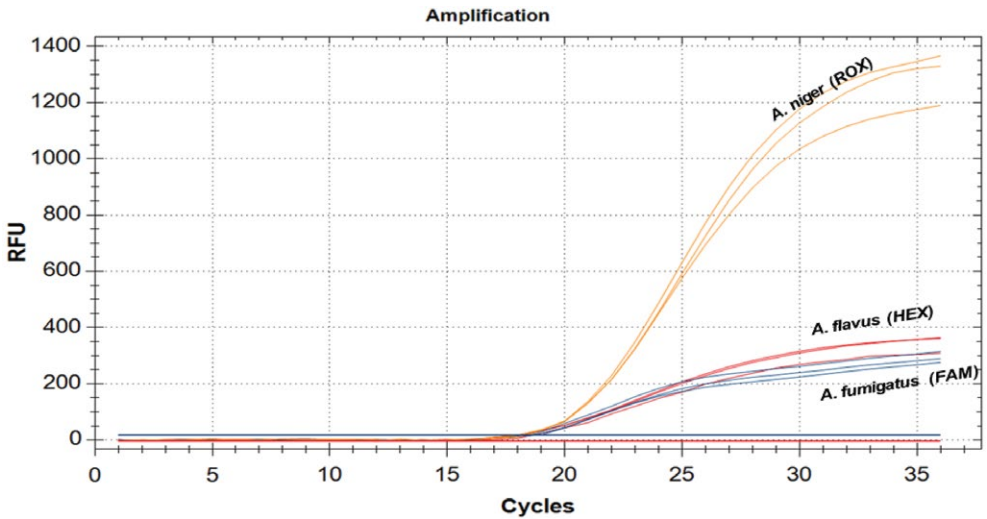


Рис. 2. Видовая ПЦР-идентификация грибов рода *Aspergillus*
Fig. 2. Species-specific PCR identification of fungi of *Aspergillus* genera

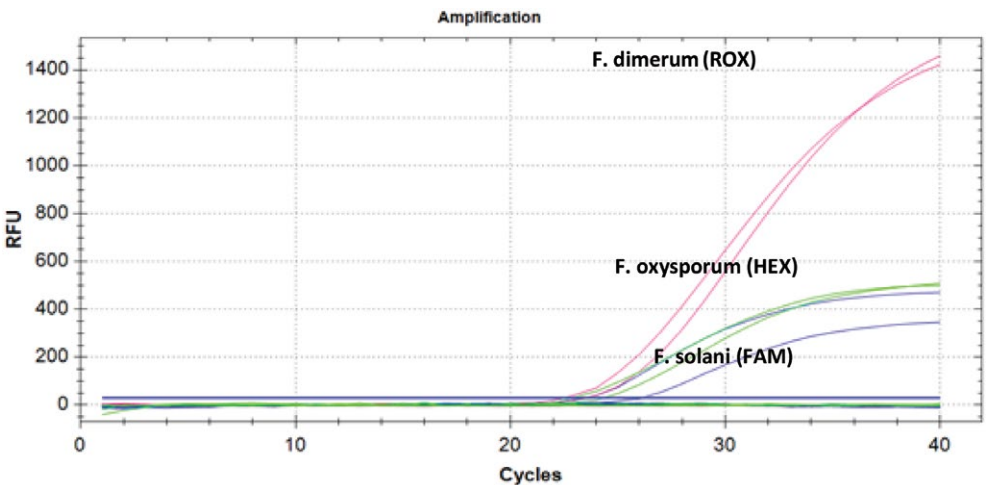


Рис. 3. Видовая ПЦР-идентификация грибов рода *Fusarium*
Fig. 3. Species-specific PCR identification of fungi of *Fusarium* genera



с различными концентрациями противогрибковых лекарственных средств – в преимущественном диапазоне от 0,002 до 32,0 мкг/мл. Оценка результатов проводится по нижнему краю эллипсоидной зоны задержки роста плесневой микробиоты на чашках Петри со средой RPMI. Последующая верификация чувствительности либо резистентности исследуемых филаментозных микромицет выполняется с применением установленных показателей МИК.

С учетом установления в EUCAST критериев интерпретации МИК лишь для ограниченного ряда плесневых микромицет проведен анализ результатов исследований антимикотической активности позаконазола, амфотерицина В, вориконазола и итраконазола в отношении 15 выделенных из клинического материала (БАЛ, ТБД и биоптаты легких) штаммов *Aspergillus fumigatus*. Выявленные параметры МИК колебались в диапазоне от 0,002 до 32 мг/л. Наиболее чувствительными исследованные микромицеты были к применению вориконазола (86,67%; 13 из 15 штаммов). При этом в отношении единичных антимикотикорезистентных культур (13,33%; 2 из 15 штаммов) *Aspergillus fumigatus* МИК вориконазола составила 1,5 мг/л при установленном референтном параметре 1 мг/л.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сопутствующие инфекционные осложнения, вызываемые различными видами плесневой микрофлоры, продолжают оставаться одной из актуальных проблем в лечении детей с онкогематологической патологией. Основным плесневым патогеном при поражении дыхательных путей и органов дыхания являются возбудители рода *Aspergillus* и в частности – *Aspergillus fumigatus*. Имеет место обнаружение возбудителей так называемых редких микозов (фузариий, мукоромицет, геотрихий), характеризующихся в ряде случаев выраженной агрессивностью в плане развития клинических проявлений инвазивных микозов и устойчивостью к применению противогрибковых препаратов. Эффективность лабораторной диагностики плесневых инвазивных микозов во многом определяется внедрением и комплексным использованием современных диагностических подходов в виде масс-спектрометрического анализа, ПЦР-диагностики, определения уровней биологических маркеров. Необходимо проводить постоянный мониторинг родового и видового разнообразия циркулирующей в конкретном медучреждении грибковой микрофлоры (в первую очередь – плесневой этиологии) с целью своевременного приобретения и внедрения в лабораторную практику соответствующих необходимых диагностических технологий, методов и реагентов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Supatharawanich S., Narkbunnam N., Vanthana 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. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2021.039>
2. Calle-Miguel L., Garido-Colino C., Santiago-García B., et al. Changes in epidemiology of invasive fungal disease in a Pediatric Hematology and Oncology Unit: the relevance of breakthrough infections. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23(1):348. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08314-9>
3. Duus R.M., Moeller J.B., Mathius R. Occurrence and Case Fatality Rate of Invasive Aspergillosis in Children With Acute Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2024;13(9):475–485. <https://doi.org/10.1093/jpids/piae079>
4. Stone N., Gupta N., Schwartz I. Mucormycosis: time to address this deadly fungal infection. *The Lancet Microbe*. 2021;2(8):e343–e344. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00148-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00148-8)
5. 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. <https://doi.org/10.3390/jof6040212>

6. Cardona S., Yusef S., Silva E., et al. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Alternaria* spp.: A case report. *Journal of Medical Mycology Case Reports*. 2019;27:11–13. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.12.001>
7. Del Principe M.L., Sarmati L., Cefalo M., et al. A cluster of *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*) infection in hematological patients: a first Italian report and review of literature. *Mucoses*. 2016;59(9):594–601. <https://doi.org/10.1111/myc.12508>
8. Dinikina Y.V., Shagdileeva E.V., Khostelidi S., et al. 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. <https://doi.org/10.36488/cmac.2022.1.14-22> (In Russian)
9. Gopal A., Singh I., Arora N. Management of mucormycosis coexisting with aspergillosis in pediatric age group – a case report. *The Egyptian Journal of Otolaryngology*. 2023;39(1):1–5. <https://doi.org/10.1186/s43163-023-00451-x>
10. Sharma B., Camble U., Gnosh G., et al. Invasive Rhinosinusitis due to *Alternaria alternata* and *Rhizopus arrhizus* Mixed Infection: A case report and Review. *International Journal of Infection*. 2021;4(4). ISSN 2383-1413. <https://doi.org/10.5812/iji.42127>
11. Honsig S., Selitsch B., Hollenstein M., et al. Identification of Filamentous Fungi by MALDI-TOF Mass Spectrometry: Evaluation of Three Different Sample Preparation Methods and Validation of an In-House Species cutoff. *Journal of Fungi*. 2022;8(4):383. <https://doi.org/10.3390/jof8040383>
12. Mendonça A., Carvalho-Preira J., Franco-Duarte R., et al. Optimization of Quantitative PCR Methodology for Detection of *Aspergillus* spp. and *Rhizopus arrhizus*. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2022;26(5):511–525. <https://doi.org/10.1007/s40291-022-00595-1>
13. Seo H., et al. Diagnostic performance of real-time polymerase chain reaction assay on blood for invasive aspergillosis and mucormycosis. *Mycoses*. 2021;64(12):1554–1562. <https://doi.org/10.1111/myc.13319>
14. Lass-Flörl C., Samardzic E., Knoll M. Serology anno 2021 – fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(9):1230–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.02.005>



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.003>
УДК 616-074/-076.3:[578.52:578.233.42]



Осипкина О.В.¹, Воропаев Е.В.¹✉, Воропаева А.В.², Валентович Л.Н.³, Рымко А.Н.⁴,
Акалович С.Т.⁴, Ковалев А.А.¹

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, Гомель, Беларусь

³ Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁴ Общество с ограниченной ответственностью «АртБиоТех», Минск, Беларусь

Разработка и апробация метода количественного определения ДНК вирусов рода Alphatorquevirus

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста – Осипкина О.В.; концепция исследования, интерпретация данных, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования – Воропаев Е.В.; концепция исследования, сбор данных – Воропаева А.В.; сбор данных и их анализ, написание текста, редактирование – Валентович Л.Н.; дизайн исследования, анализ данных – Рымко А.Н.; дизайн исследования, анализ данных – Акалович С.Т.; анализ данных, редактирование – Ковалев А.А.

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения задания ГПНИ «Трансляционная медицина», подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки» 3.38 «Разработать алгоритм прогнозирования пост-COVID-19-ассоциированной патологии на основании изучения клинико-лабораторных и функциональных показателей» (рег. № 20220464, руководитель проекта к. м. н., доцент Е.В. Воропаев, сроки выполнения задания – 2022–2024 гг.).

Благодарности: авторы выражают благодарность Рубаник Н.Н., Зяткову А.А., Шафоросту А.А. за участие в проведении лабораторных исследований.

Подана: 16.07.2025

Принята: 10.11.2025

Контакты: voropaev.evgenii@gmail.com

Резюме

Введение. Вирусы семейства Anelloviridae (анелловирусы), к которому относят род Alphatorquevirus, считают одним из основных компонентов человеческого виroma. Интерес к определению вирусной нагрузки обуславливает актуальность разработки и стандартизации качественных и количественных методов выявления.

Цель. Разработать и апробировать метод выявления и количественного определения ДНК представителей рода Alphatorquevirus в биологическом материале человека на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени.

Материалы и методы. Биологическим материалом для исследования стали плазма и лейкоциты крови 92 практически здоровых человек, плазма и лейкоциты крови, слюна и назофарингеальные мазки 28 пациентов с установленным диагнозом вторичного иммунодефицитного состояния. При разработке молекулярно-генетического метода выявления и количественного определения ДНК вирусов рода Alphatorquevirus человека использована TaqMan-ПЦР (полимеразная цепная реакция), проведена верификация методом секвенирования.

Результаты. Выполнен дизайн и подобрана нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus по высококонсервативной области генома; подобраны оптимальный состав реакционной смеси, программа амплификации. Разработан молекулярно-генетический метод выявления и количественного определения ДНК вирусов рода Alphatorquevirus

в биологическом материале человека. Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 500 копий/мл, диагностическая чувствительность – 95,7% (95% ДИ: 0,878; 0,991), диагностическая специфичность – 83,3% (95% ДИ: 0,626; 0,953), диагностическая эффективность – 92,5% (95% ДИ: 0,851; 0,969), предсказательная ценность положительного результата теста – 94,3% (95% ДИ: 0,86; 0,984), отрицательного – 87,0% (95% ДИ: 0,664; 0,972). Аналитическая специфичность метода определена *in silico* и секвенированием продуктов амплификации, расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами PV806635.1 – PV806639.1. Утверждена МЗ Республики Беларусь инструкция по применению разработанного метода исследования «Метод количественного определения вирусов TTV в биологическом материале / О.В. Осипкина, Е.В. Воропаев, А.Н. Рымко, С.Т. Акалович, А.В. Воропаева, В.М. Мицура, А.А. Ковалев. Инструкция по применению № 014-0525».

Заключение. В основе разработанного молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов Alphatorquevirus в биологическом материале человека, лежит принцип мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени, использованы оригинальные олигонуклеотидные праймеры и молекулярный зонд к консервативному региону генома вирусов рода Alphatorquevirus, подобраны оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации. Определены аналитические параметры метода и диагностические критерии выполняемых с его использованием тестов. Метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, полимеразная цепная реакция, количественная оценка, разработка метода, апробация



Osipkina O.¹, Voropaev E.¹✉, Voropaeva A.², Valentovich L.³, Rymko A.⁴, Akalovich S.⁴, Kovalev A.¹

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

³ Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

⁴ "ArtBioTech" LLC, Minsk, Belarus

Elaborating and Testing of a Quantification Method for Alphatorquevirus Genus Viruses DNA

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, data collection, results analysis and interpretation, text writing – Osipkina O.; study concept, data interpretation, final approval of the article version for publication – Voropaev E.; study concept, data collection – Voropaeva A.; data collection and analysis, text writing, editing – Valentovich L.; study design, data analysis – Rymko A.; study design, data analysis – Akalovich S.; data analysis, editing – Kovalev A.

Funding: the study was conducted as part of the State Program for Scientific Research "Translational Medicine" subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science" 3.38 "To create an algorithm for predicting post-COVID-19 associated pathology based on the study of clinical, laboratory, and functional indicators" (registration number 20220464, project manager PhD, Associate Professor E. Voropaev; assignment completion date: 2022–2024).

Acknowledgments: the authors express their gratitude to N. Rubanik, A. Zyatkov, and A. Shaforost for their participation in the laboratory research.

Submitted: 16.07.2025

Accepted: 10.11.2025

Contacts: voropaev.evgenii@gmail.com

Abstract

Introduction. Viruses of the Anelloviridae family (Anelloviruses), which includes the Alphatorquevirus genus, are considered one of the main components of the human virome. The interest in determining viral load stipulates the relevance of elaborating and standardizing both qualitative and quantitative detection methods.

Purpose. To elaborate and test a method for detecting and quantifying DNA of Alphatorquevirus species in human biological material based on real-time polymerase chain reaction.

Materials and methods. The biological material for testing was plasma and leukocytes from 92 apparently healthy individuals, and plasma and leukocytes from the blood, saliva and nasopharyngeal swabs from 28 patients with established diagnoses of secondary immunodeficiency. TaqMan PCR (polymerase chain reaction) was used to elaborate a molecular genetic method for detecting and quantifying human Alphatorquevirus DNA, and verification was performed by sequencing.

Results. The design and nucleotide sequence of primers and TaqMan probes for detecting Alphatorquevirus DNA in a highly conserved region of the genome were completed. The optimal reaction mixture composition and amplification program were selected. A molecular genetic method for detecting and quantifying DNA of Alphatorquevirus genus viruses in human biological material was elaborated. The analytical sensitivity of the method elaborated was 500 copies/ml, diagnostic sensitivity was 95.7% (95% CI: 0.878; 0.991), diagnostic specificity was 83.3% (95% CI: 0.626; 0.953), diagnostic efficiency was 92.5% (95% CI: 0.851; 0.969), the predictive value of a positive test result was 94.3% (95% CI: 0.86; 0.984), and of a negative result was 87.0% (95% CI: 0.664; 0.972). The analytical specificity of the method was determined *in silico* and by sequencing

the amplification products. The deciphered nucleotide sequences were deposited in the NCBI GenBank under accession numbers PV806635.1 – PV806639.1. The instructions for use of the elaborated research method "Method for TTV viruses quantification in biological material / Osipkina O., Voropaev E., Rymko A, Akalovich S., Voropaeva A., Mitsura V., Kovalev A. Instructions for use No. 014-0525" were approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus.

Conclusion. The elaborated molecular genetic method of laboratory diagnostics, enabling both qualitative detection and quantification of *Alphatorquevirus* DNA in human biological material, is based on the principle of multiplex real-time PCR. Original oligonucleotide primers and a molecular probe targeting a conserved region of the *Alphatorquevirus* genome were used. The optimal reaction mixture composition and amplification program were selected. The analytical parameters of the method and the diagnostic criteria for tests performed using the method were determined. The method demonstrated acceptable repeatability and reproducibility.

Keywords: laboratory diagnostics, polymerase chain reaction, quantification, method elaboration, testing

■ ВВЕДЕНИЕ

Вирусы рода *Alphatorquevirus* являются наиболее часто встречающимися среди анелловиров, инфицирующих человека; род включает несколько десятков видов и характеризуется большим генетическим разнообразием [1]. Именно к роду *Alphatorquevirus* относится вирус *Torque teno virus* (TTV), впервые выделенный в 1997 г. Т. Нисидзава с коллегами [2] у пациента после переливания крови. Таксономия семейства *Anelloviridae* регулярно обновляется. Согласно последним рекомендациям Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV, 2021), все названия видов вирусов оформляются в биномиальном формате. Так, сейчас вид *Alphatorquevirus homin1* соответствует традиционному вирусу TTV1, который упоминается в большинстве публикаций и диагностических рекомендациях [3, 4].

Представители рода *Alphatorquevirus* повсеместно распространены, составляют 97% всех анелловиров и формируют значительную долю (68%) виroma крови [1], могут быть обнаружены у 90% здоровых людей [5], а инфицированность среди доноров крови достигает 100% [6]. Считается, что вирусы рода *Alphatorquevirus* вызывают хроническую инфекцию без установленного заболевания или клинических проявлений, а концентрация этих вирусов в плазме крови рассматривается как потенциальный индикатор состояния иммунной системы и может использоваться, в частности, для прогнозирования риска инфицирования и отторжения трансплантата после пересадки солидных органов [1]. Поэтому в связи с широкой распространенностью вирусов рода *Alphatorquevirus* диагностическое значение имеет прежде всего их количественная, а не качественная оценка.

Обнаружение вирусов рода *Alphatorquevirus* осуществляется с помощью молекулярно-генетических методов (из-за отсутствия клеточных культур): стандартная ПЦР, вложенная ПЦР (nested-PCR), ПЦР в реальном времени (real-time PCR), цифровая капельная ПЦР, секвенирование, в том числе высокопроизводительное.



Предпринимаются попытки разработать тесты на основе иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител, специфичных к белкам вириона Alphatorquevirus, но пока такие тесты не получили широкого распространения из-за слабой корреляции между серопозитивностью и вирусной нагрузкой [1].

В течение многих лет для выявления вирусов семейства Anelloviridae и оценки их количества исследователи использовали разработанные ими собственные (in-house) тест-системы [7], работы в этом направлении ведутся и в Республике Беларусь [8]. В последние годы был разработан и сертифицирован для клинического применения коммерческий набор TTV R-GENE (IVDR – for in vitro diagnostic use, для диагностики in vitro) (BioMerieux, Франция). Данный набор тестировали во многих исследованиях для сравнения с in-house тест-системами [9, 10]. Также проведено мультицентровое исследование с участием 13 лабораторий, показавшее высокую точность обнаружения и количественной оценки ДНК вирусов рода Alphatorquevirus [11]. Однако в Республике Беларусь в настоящее время отсутствуют зарегистрированные наборы реагентов для проведения данных анализов.

При разработке количественных методов определения нуклеиновых кислот нужно учитывать ряд требований, таких как выбор биологического материала, его отбор и хранение, выделение нуклеиновых кислот, подбор праймеров, зондов, контролей и калибраторов, условия проведения ПЦР, определение эффективности анализа (эффективность реакции амплификации, предел обнаружения и др.), определение диагностических показателей [12]. При подборе праймеров для выявления ДНК Alphatorquevirus необходимо учесть основные требования к их дизайну [13], а также структуру генома, включающего как варибельные, так и консервативные участки, что существенно влияет на эффективность детекции [1]. Помимо выбора оптимальных праймеров, большое значение для характеристики метода детекции вирусов имеют его аналитические параметры, такие как предел обнаружения (LOD – Limit of Detection) и предел количественного определения (LOQ – Limit of Quantitation). Под пределом обнаружения понимают наименьшее количество аналита, которое можно выявить с уровнем достоверности 95% без точного количественного определения [12]. Аналитическую чувствительность метода оценивают с помощью серии разведений [14]. Пределом количественного определения является наименьшее количество измеряемой величины в образце, которое может быть количественно определено с указанной приемлемой точностью при указанных экспериментальных условиях [15]. LOQ определяют как минимальную концентрацию, при которой коэффициент вариации (CV) должен быть $\leq 35\%$ от рассчитанных ранее концентраций [15]. В таких случаях, если коэффициент вариации превышает установленный порог (35%) при определенном целевом количестве, затем снижается ниже порога при меньшем количестве, а затем снова увеличивается, за LOQ следует принимать наименьшее целевое значение, при котором CV не превышает установленный порог. Такие колебания обусловлены неточностью расчетных коэффициентов вариации, как правило, из-за слишком малого количества повторов при постановке тестов [15].

Под прецизионностью, согласно ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002, понимают степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях. Повторяемость (сходимость) – оценка результатов, полученных с помощью одного и того же метода одним и тем же оператором в одной и той же лаборатории с тем же оборудованием на одних и тех же образцах (условия

повторяемости) [16]. Воспроизводимость оценивают по результатам, полученным одним и тем же методом на идентичных объектах в разных лабораториях с использованием различного оборудования [16].

Следует отметить, что основными параметрами валидационной оценки при научных исследованиях, которые характеризуются низкой пропускной способностью и множеством различных типов образцов, являются аналитическая чувствительность и специфичность [12].

Несмотря на неослабевающий интерес исследователей к вирусам рода Alphatorquevirus и другим анелловirusам с момента их открытия, многие вопросы по-прежнему не решены, а роль данных вирусов в здоровье человека остается неясной. Есть мнение, что нельзя исключать патогенность отдельных представителей семейства Anelloviridae, которую сложно заметить из-за преобладания непатогенных форм [17]. Высокая представленность вирусов рода Alphatorquevirus в вируме человека, широкое распространение, вездесущность и множество нерешенных вопросов обуславливают непрекращающиеся исследования, в том числе и в области лабораторной диагностики данного вируса. Возможно, будут разработаны диагностические системы, которые позволят не только обнаруживать и количественно оценивать весь спектр генетического разнообразия вирусов рода Alphatorquevirus, но и идентифицировать конкретные группы и генотипы.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать и апробировать метод выявления и количественного определения ДНК представителей рода Alphatorquevirus в биологическом материале человека на основе полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет». Для разработки и апробации метода использовали биологический материал здоровых добровольцев (плазма и лейкоцитарная фракция крови) (N=92, 16 (17,4%) мужчин, 76 (82,6%) женщин, средний возраст – 39 лет (+/-12,44) [21,00; 64,00]), и пациентов с установленным диагнозом вторичного иммунодефицитного состояния на фоне основного заболевания (плазма и лейкоцитарная фракция крови, слюна, назофарингеальные мазки) (N=28, 12 (42,9%) мужчин, 16 (57,1%) женщин, средний возраст – 59,82 года (+/-18,50) [19,00; 87,00]). Участники исследования (жители г. Гомеля и Гомельской области) были проинформированы о целях и планируемых процедурах, от всех получено письменное информированное согласие.

При разработке метода выявления и количественного определения ДНК вирусов рода Alphatorquevirus человека использовали TaqMan-ПЦР, основанную на применении флуоресцентно-меченых гидролизуемых олигонуклеотидных зондов (проб) и 5'-экзонуклеазной активности полимеразы [18, с. 42]. Выявление и определение количества ДНК Alphatorquevirus включало два этапа: выделение ДНК из образцов биологического материала и мультиплексная ПЦР. Выделение нуклеиновых кислот из образцов биологического материала проводили с использованием набора реагентов «РИБО-преп» («Амплисенс» ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ) согласно инструкции производителя.



Дизайн праймеров и зондов проводили с использованием программ для подбора и анализа олигонуклеотидных праймеров Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). С целью обеспечения высокой чувствительности и специфичности теста при максимальном охвате вариантов вируса в качестве мишени выбран консервативный регион генома вирусов рода *Alphatorquevirus*. Для его идентификации были использованы нуклеотидные последовательности всех представителей рода, имеющихся в базе данных геномов Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=687331>), проведено объединение последовательностей в многомерный FASTA-файл и множественное выравнивание при помощи онлайн-ресурса с алгоритмом Muscle: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/muscle>.

Синтез праймеров, зондов, внутреннего контрольного образца (ВКО) и стандартов осуществлен в ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь). Для проведения ПЦР использованы реагенты производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь).

Оптимизация ПЦР включала подбор компонентов реакционной смеси и параметров термоциклирования (температурный профиль и длительность каждого этапа цикла). При выявлении ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* в лейкоцитах крови, назофарингеальных мазках в качестве эндогенного внутреннего контроля использована одновременная амплификация консервативного участка генома *Alphatorquevirus* и участка β -глобинового гена человека. В ПЦР-смесь включали праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* и β -глобинового гена человека (β -глобиновый ген должен присутствовать в образце в количестве, эквивалентном количеству клеток, – 10^3 – 10^5 геном-эквивалентов). При выявлении ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* в плазме крови и слюне выделение нуклеиновых кислот из каждого образца биоматериала проводили в присутствии экзогенного ВКО. В ПЦР-смесь включали праймеры и TaqMan-зонды для выявления ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus* и для выявления ДНК ВКО. В каждую постановку ПЦР включали анализируемые образцы, калибраторы и отрицательный контрольный образец. В качестве отрицательного контрольного образца использовали буфер для элюции, не содержащий целевые ДНК и проходивший все стадии пробоподготовки.

Проведение реакции амплификации, анализ и учет результатов осуществляли при помощи амплификатора Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Подобрана программа амплификации: денатурация 1 цикл – 95 °C, 15 мин; 45 циклов (95 °C – 5 с, 63 °C – 10 с, 67 °C – 10 с), каналы детекции HEX/Yellow (ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*) и FAM/Green (ДНК β -глобина, ДНК ВКО). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения используемого амплификатора, настройки устанавливали в соответствии с инструкцией к нему. Для стандартов (калибраторов) детектировались характерные кинетические кривые по каждому из каналов (FAM/Green и HEX/Yellow). Данные считали валидными, если были получены правильные результаты для стандартов (калибраторов), ВКО и отрицательного образца. Для построения калибровочной прямой в реакцию добавляли стандартные растворы калибраторов с известными показателями концентрации. После достижения оптимальных параметров амплификации (наклон, эффективность, коэффициент корреляции R^2) полученные количественные показатели (копии ДНК вирусов рода *Alphatorquevirus*, β -глобина человека и ВКО) использовали для расчета вирусной нагрузки в биологических образцах.

Для количественной оценки вирусной нагрузки в плазме крови и слюне использовались значения количества копий ДНК вирусов рода Alphatorquevirus на миллилитр (копии/мл) и их логарифмическое преобразование ($\log_{10}$ копий/мл), рассчитанные с помощью программного обеспечения амплификатора.

Для количественной оценки вирусной нагрузки в клетках крови, нозофарингеальных мазках проводили расчет вирусной нагрузки по формуле, которая широко используется при количественной оценке ДНК вирусов в пробах ДНК при выделении тотальной ДНК из цельной крови, лейкоцитов крови, биоптатов. Коэффициент пересчета: 10^5 клеток = 2×10^5 геномов человека.

Формула для расчета вирусной нагрузки Alphatorquevirus в клетках крови, нозофарингеальных мазках:

$$\log_{10} \text{копий ДНК Alphatorquevirus} / 10^5 \text{ клеток} = \\ = \log_{10} \frac{\text{число копий ДНК Alphatorquevirus в ПЦР пробе}}{\text{число копий ДНК } \beta\text{-глобина в ПЦР пробе}} \times 2 \times 10^5.$$

Аналитическая специфичность разработанных олигонуклеотидов и зондов определена *in silico* с помощью программного приложения Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также при исследовании клинического материала с последующим подтверждением результата секвенированием продуктов амплификации. Секвенирование проведено по методу Сэнгера (метод обрыва цепи) с использованием прибора «Нанофор-05» (РФ).

Аналитическую чувствительность метода оценивали с использованием серии последовательных разведений положительного контрольного образца (K1, 10^3 копий/мл ДНК TTV). Были протестированы концентрации, содержащие 500, 250 и 125 копий/мл, каждая в шести повторях. Наименьшее разведение с показателем обнаружения 6/6 было определено как предел обнаружения [14]. Предел количественного определения рассчитан по рекомендациям для исследований с малым числом повторов [15].

Оценка повторяемости и воспроизводимости проведена в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 [19]. Повторяемость оценена на базе НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» при проведении анализа стандартного образца в девяти повторностях. Значение стандартного отклонения повторяемости (S_r) составило 0,0406 ($\log_{10}$ копий в мл), коэффициент вариации (CV) – 0,82%, предел повторяемости (r) – 0,1138 ($\log_{10}$ копий в мл). Воспроизводимость оценена при проведении анализа 21 образца биологического материала на базе НИЛ УО «Гомельский государственный медицинский университет» и лаборатории вирусологических исследований, диагностики ВИЧ/СПИД и особо опасных инфекций ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья».

Диагностическую надежность лабораторного теста оценивали по рекомендованным критериям: диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, диагностическая эффективность, предсказательная ценность положительного (ПЦ+) и отрицательного результатов теста (ПЦ–) [20, с. 124]. Оценка диагностической информативности лабораторного теста базируется на предварительном точном установлении диагноза заболевания с использованием рентгенологического, ультразвукового и других видов исследований [20, с. 124], однако в данном случае



такой подход невозможен, так как в настоящее время считается, что вирусы рода *Alphatorquevirus* являются пантропными и повсеместно распространены, а их патогенность в отношении человека не подтверждена [1]. Для расчета диагностических характеристик можно использовать сравнение результатов индексного теста с результатами наилучшего в настоящее время и вполне доступного теста, называемого эталонным стандартом. Эталонным стандартом может быть «золотой стандарт» с чувствительностью и специфичностью, равными 100% [21]. Поскольку в Республике Беларусь в настоящее время отсутствуют зарегистрированные наборы реагентов для выявления и количественной оценки представителей рода *Alphatorquevirus*, можно сделать вывод об отсутствии теста, который допустимо назвать «золотым стандартом». Существуют методы, разработанные и используемые для оценки диагностической точности тестов в случаях, когда «золотой стандарт» отсутствует или недоступен [21]. Например, применяют метод построения составного эталонного стандарта. Этот метод объединяет результаты нескольких несовершенных тестов (за исключением индексного теста) с заранее заданным правилом для построения эталонного стандарта, используемого для оценки индексного теста [21]. Обоснованием для такого вида сравнения в выполненном исследовании послужили также опубликованные работы, в которых ввиду высокого разнообразия генетической последовательности вируса для детекции всего спектра существующих генотипов в пределах рода *Alphatorquevirus* предлагается использовать несколько наборов праймеров [22]. Для построения составного эталонного стандарта были объединены результаты нескольких тестов выявления TTV (за исключением разработанного метода), полученных при проведенных ранее исследованиях [23]: с помощью наборов праймеров для выявления по кодирующему и консервативному регионам и коммерческого набора реагентов «ПОЛИГЕП-TTV» (ООО «Научно-производственная фирма ЛИТЕХ», РФ). С использованием указанных вариантов технологии исследования было оценено выявление ДНК TTV в одной из целевых групп пациентов (здоровые добровольцы). Для расчета критериев диагностической надежности использованы широко известные формулы [20, с. 125].

Выявление *Alphatorquevirus*-специфических иммуноглобулинов (TTV-IgG и TTV-IgM) в плазме крови здоровых добровольцев осуществляли методом ИФА с использованием наборов реагентов Qualitative Human Transfusion Transmitted Virus Antibody IgG (TTV-IgG) Elisa Kit MyBioSource.com и Qualitative Human Transfusion Transmitted Virus Antibody IgM (TTV-IgM) Elisa Kit MyBioSource.com, предназначенных для исследований, не для диагностики, интерпретация результатов согласно инструкции производителя.

Статистический анализ данных выполнялся с помощью языка программирования R (версия 4.5.0), с применением библиотеки tidyverse (версия 2.0.0), ggstatsplot (версия 0.12.1), rstatix (0.7.2), cutpointr (1.1.2), caret (6.0.94), pROC (1.18.4). Описание количественных признаков представлено в виде среднего значения и стандартного отклонения (Mean (SD)), минимума и максимума – для оценки диапазона разброса значений показателя (Min; Max). Для проверки соответствия распределения количественных данных нормальному распределению применялся критерий Шапиро – Уилка (W). Для оценки повторяемости использованы значения стандартного отклонения повторяемости (S), коэффициента вариации (CV), предела повторяемости (r). Для оценки воспроизводимости использованы значения стандартного отклонения

воспроизводимости (S_R), относительного стандартного отклонения воспроизводимости (RSD_R), предела воспроизводимости (R). Категориальные признаки представлены в виде значений абсолютных и относительных частот (долей) встречаемости значений признака. Анализ согласованности диагностических тестов выполнен с помощью теста МакНемара – Боукера и каппы Коэна (к Коэна). Для оценки диагностической эффективности рассчитаны операционные характеристики: диагностическая чувствительность (Se), диагностическая специфичность (Sp), точность (Acc), положительная (PPV) и отрицательная (NPV) прогностическая ценность.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выполнен дизайн и подобрана нуклеотидная последовательность праймеров и TaqMan-зонда для выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus: TTV-Art-прямой-5'-cc[+g]aatg[+g][+c]tgagtt-3' ([+N] – LNA-модификация), TTV-Art-обратный-5'-gcccttgactbcggt-3'; TTV-Art-зонд-5'-HEX-cggcaccgcscct-MGB-BHQ1-3'. С помощью множественного выравнивания найдена высококонсервативная область генома вирусов рода Alphatorquevirus для отжига праймеров (в качестве примера на рисунке приведена зона отжига обратного праймера), тем не менее один из праймеров имеет вырожденную позицию. Для увеличения аффинности к мишени использованы LNA- (Locked Nucleic Acid) и MGB-модификации (Minor Groove Binder) праймеров.

Для амплификации участка β -глобинового гена человека выбраны праймеры [24] и выполнен дизайн TaqMan-зонда: β -глобин-прямой-5'-tgcacgtggatcctgagaact-3', β -глобин-обратный-5'-aattctttgccaaagtatggg-3', β -глобин-зонд-5'-FAM-caggctcctgggcaactgtgctg-BHQ1-3'.

В качестве положительного контроля и для проведения количественной оценки использованы синтетические стандарты (калибраторы) с известным числом копий ($K1 - 10^3$ копий/мл, $K2 - 10^4$ копий/мл, $K3 - 10^5$ копий/мл, $K4 - 10^6$ копий/мл, $K5 - 10^7$ копий/мл, $K6 - 10^8$ копий/мл).

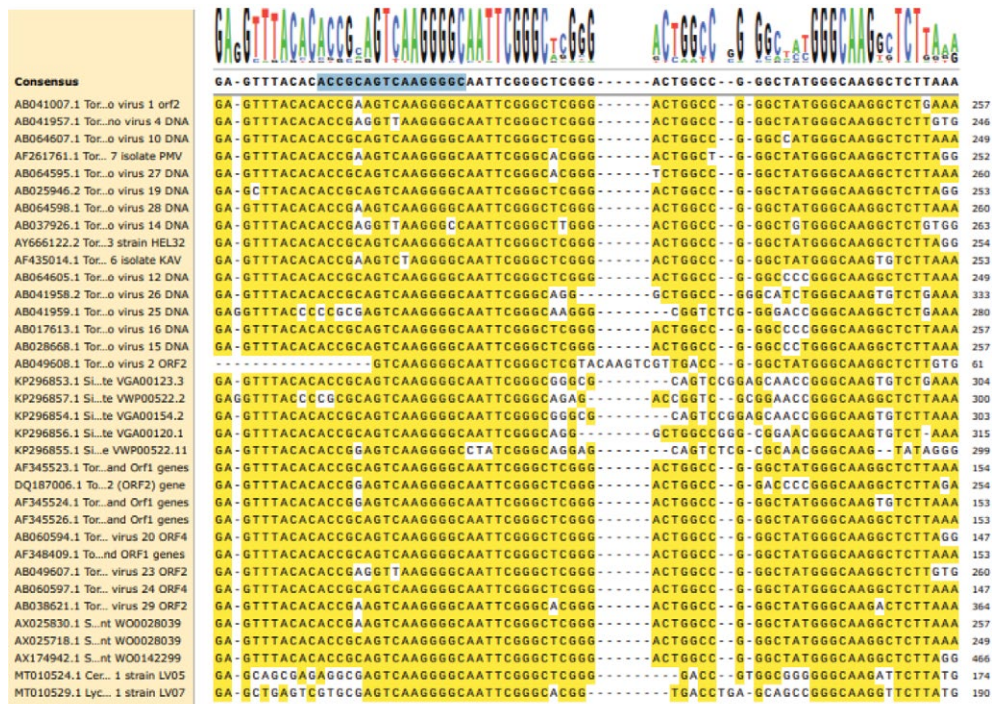
Стандарты (калибраторы) ДНК β -глобинового гена: tgcacgtggatcctgagaactcaggctcctgggcaactgtgctggtctgtgtgctggccatcactttggcaagaatt.

На рисунке представлены результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей представителей рода Alphatorquevirus, вошедших в базу данных геномов NCBI.

Стандарты (калибраторы) для выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus: Ccgaatggctgagtttccacgcccgtccgacgsggtgaagccacggagggagatcagcgctcccgagggcggtgcgaggtgagtttacacaccgacgtcaaggggc.

Структура экзогенного ВКО, а также структура праймеров [25] и оригинального зонда для его выявления: ВКО-прямой-5'-gtcgcggttaattggcgc-3', ВКО-обратный-5'-ggccacgtgttttgatcga-3', ВКО-зонд-5'-FAM-atcttcgtttagggcaagatcggcacaggcca-BHQ1-3', ВКО-стандарт5'ggccacgtgttttgatcgaactttcgatcttcgtttagggcaagatcggcacaggccagccggcgacggaccggcgccaattaccgcgac3'.

Аналитическая специфичность разработанных олигонуклеотидов и зондов определена *in silico*, а также при исследовании нескольких клинических образцов. Полученные ампликоны секвенировали, расшифрованные нуклеотидные последовательности сопоставляли с референсными геномами вирусов рода Alphatorquevirus, после чего те были депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами: PV806635.1, PV806636.1, PV806637.1, PV806638.1, PV806639.1.



Результат множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей всех представителей рода Alphatorquevirus, которые занесены в базу данных геномов NCBI
Result of multiple alignment of nucleotide sequences of all representatives of the genus Alphatorquevirus, which are presented in the NCBI genome database

Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 500 копий/мл (5 копий в реакцию). Такое значение аналитической чувствительности метода согласуется с данными литературы о возможностях количественного ПЦР-анализа [15]. Так, исследователями биоаналитической лаборатории TATAA Biocenter показано, что в условиях отсутствия ошибок LOD при 95%-й достоверности составляет 3 молекулы ДНК-матрицы [15], а для большинства реальных образцов LOD зависит от шума, вносимого выборкой, методов выделения и других факторов и может быть существенно выше. Предел количественного определения разработанного метода составил 1500 копий/мл. Диапазон количественной оценки метода составил 1500 копий/мл – 10^8 копий/мл. Полученные характеристики сопоставимы с характеристиками тест-системы TTV R-GENE (BioMerieux, Франция), представленными в открытом доступе на интернет-ресурсах: данная система основана на ПЦР в реальном времени, технология TaqMan (целевой регион TTV 5'-UTR область, 128 пар нуклеотидов) включает набор для выделения, премикс для амплификации, внутренний контроль, отрицательный контроль, четыре стандарта количественного определения; заявленный динамический диапазон количественной оценки составляет 250 копий/мл – 10^9 копий/мл, позволяет обнаружить и измерить ДНК TTV в образцах плазмы и цельной крови [26].

Значение стандартного отклонения воспроизводимости (S_R) составило 0,5804 ($\log_{10}$ копий ДНК TTV / 10^5 клеток), относительное стандартное отклонение воспроизводимости (RSD_R) – 19,05%, доля общей вариации, обусловленная системой измерений (GRR), – 6,5%, предел воспроизводимости (R) – 1,6251 ($\log_{10}$ копий ДНК Alphatorquevirus / 10^5 клеток). Полученный результат сопоставим с внутри- и межлабораторными показателями, продемонстрированными в мультицентровом исследовании коммерческого набора TTV R-GENE (BioMerieux): межлабораторное стандартное отклонение составляет 0,17 $\log_{10}$ копий/мл и внутрिलाбораторное – от 0,03 до 0,20 $\log_{10}$ копий/мл (в ходе внедрения), а также межлабораторное SD – 0,19 $\log_{10}$ копий/мл и внутрिलाбораторное SD – от 0,07 до 0,18 $\log_{10}$ копий/мл (в ходе испытаний) [11]. Таким образом, разработанный метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости.

Антитела класса М к вирусам рода Alphatorquevirus выявлены у 14 (15,2%) здоровых добровольцев, антитела класса G к вирусам рода Alphatorquevirus – у 37 (40,2%).

Сравнение ряда методов выявления вирусов рода Alphatorquevirus в плазме крови здоровых добровольцев, включая ИФА на TTV-IgG и TTV-IgM, ПЦР с использованием наборов праймеров для кодирующего и консервативного регионов, применение коммерческого набора «ПОЛИГЕП-TTV» и предложенного нами молекулярно-генетического метода позволили получить результаты, сводящиеся к выявлению существенной степени согласия между разработанным методом и составным эталонным стандартом (коэффициент «к Коэна» составил 0,801); установлению умеренной степени согласия между разработанным методом, определением по консервативному региону (вложенная ПЦР), выявлением по кодирующему региону и с помощью коммерческого набора «ПОЛИГЕП-TTV» (коэффициент «к Коэна» 0,6 и 0,4 соответственно). Степень согласия между всеми вариантами выявления ДНК вирусов рода Alphatorquevirus, использованными в данном исследовании, и выявлением Alphatorquevirus-специфических иммуноглобулинов была слабой, что согласуется с данными литературы [1].

С использованием метода построения составного эталонного стандарта определены диагностические критерии: диагностическая чувствительность реализуемого с использованием разработанного метода теста составила 95,7% (95% ДИ: 0,878; 0,991), диагностическая специфичность – 83,3% (95% ДИ: 0,626; 0,953), диагностическая эффективность – 92,5% (95% ДИ: 0,851; 0,969), предсказательная ценность положительного результата теста – 94,3% (95% ДИ: 0,86; 0,984), отрицательного – 87,0% (95% ДИ: 0,664; 0,972). Коэффициент «к Коэна» составил 0,801, что указывает на существенную степень согласия анализируемых тестов (p теста МакНемара = 1). Согласно данным литературы, диагностическая специфичность теста должна быть не менее 80% [20], следовательно, разработанный метод продемонстрировал достаточно высокую диагностическую надежность.

Таким образом, разработан молекулярно-генетический метод лабораторной диагностики, позволяющий проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов Alphatorquevirus в биологическом материале человека. Метод основан на полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени в мультиплексном формате с использованием праймеров к участку β -глобинового гена человека и оригинальных олигонуклеотидных праймеров к консервативному региону генома вирусов рода Alphatorquevirus, а также молекулярных зондов; подобраны оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации.



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В основе разработанного молекулярно-генетического метода лабораторной диагностики, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов Alphatorquevirus в биологическом материале человека, лежит принцип мультиплексной ПЦР с детекцией в реальном времени, использованы оригинальные олигонуклеотидные праймеры и молекулярный зонд к консервативному региону генома вирусов рода Alphatorquevirus, подобран оптимальный состав реакционной смеси и программа амплификации.

Определены аналитические характеристики разработанного метода лабораторной диагностики инфекции, вызванной вирусами рода Alphatorquevirus (аналитическая чувствительность, аналитическая специфичность, повторяемость и воспроизводимость). Аналитическая чувствительность составила 500 копий/мл, диапазон измерений 1500 – 10⁸ копий/мл. Метод имеет приемлемые показатели повторяемости и воспроизводимости. Аналитическая специфичность метода определена *in silico* и секвенированием продуктов амплификации, расшифрованные нуклеотидные последовательности депонированы в генный банк (GenBank NCBI) под номерами PV806635.1 – PV806639.1.

Расчет диагностических критериев, выполненный по методу построения составного эталонного стандарта, показал высокую надежность разработанного молекулярно-генетического метода, позволяющего проводить качественное выявление и количественную оценку ДНК вирусов Alphatorquevirus в биологическом материале человека: диагностическая чувствительность составила 96%, диагностическая специфичность – 83%, диагностическая эффективность – 92%, предсказательная ценность положительного результата – 94% и отрицательного результата – 87%.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Brani P., Manzoor H.Z., Spezia P.G., et al. Torque Teno Virus: Lights and Shades. *Viruses*. 2025 Feb 27;17(3):334. doi: 10.3390/v17030334
2. Nishizawa T., Okamoto H., Konishib K., et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Dec;241(1):92–97. doi: 10.1006/bbrc.1997.7765
3. Virus Taxonomy: 2024 Release International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <https://ictv.global/taxonomy> (accessed 22.09.2025).
4. Varsani A., Kraberger S., Opriessnig T., et al. *Anelloviridae* taxonomy update 2023. *Arch Virol*. 2023;168:277. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05903-6>
5. Jaksch P., Görzler I., Puchhammer-Stöck E., et al. Integrated Immunologic Monitoring in Solid Organ Transplantation: The Road Toward Torque Teno Virus-guided Immunosuppression. *Transplantation*. 2022 Oct;106(10):1940–1951. doi: 10.1097/TP.0000000000004153
6. Kuczaj A., Przybyłowski P., Hrapkowicz T. Torque Teno Virus (TTV)-A Potential Marker of Immunocompetence in Solid Organ Recipients. *Viruses*. 2023 Dec 21;16(1):17. doi: 10.3390/v16010017
7. Maggi F., Pistello M., Vatteroni M., et al. Dynamics of persistent TT virus infection, as determined in patients treated with alpha interferon for concomitant hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2001 Dec;75(24):11999–2004. doi: 10.1128/JVI.75.24.11999-12004.2001
8. Semenov V.M., Yahorau S.K., Lyatos I.A., et al. Real-time PCR test system for TTV DNA detection in biological material. *Hepatology and Gastroenterology*. 2024;1:36–41. doi: 10.25298/2616-5546-2024-8-1-36-41 (in Russian)
9. Reyes N.S., Laham G., Boccia N., et al. Prospective cohort study of Torque Teno Virus (TTV) viral load kinetics and the association with graft rejection in renal transplant patients. *J Clin Virol*. 2023 Aug;165:105501. doi: 10.1016/j.jcv.2023.105501
10. Reyes N.S., Spezia P.G., Jara R., et al. Torque Teno Virus (TTV) in Renal Transplant Recipients: Species Diversity and Variability. *Viruses*. 2024 Mar 11;16(3):432. doi: 10.3390/v16030432
11. Gore E.J., Gard L., Bourgeois P., et al. TTVguideTX consortium partners. Validation, implementation and quality control of a Torque Teno Virus qPCR in a multinational clinical trial. *J Clin Virol*. 2024 Dec;175:105738. doi: 10.1016/j.jcv.2024.105738
12. Doronin M.I., Mikhailishin D.V., Sprygin A.V., et al. Current approaches to development of real-time qPCR test-kits. *Veterinary Science Today*. 2023;12(3):197–207. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207> (in Russian)
13. Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Maleev G.V., et al. Diversity of PCR primers and principles of their design. *Biomics*. 2019;11(1):23–70. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2019-04> (in Russian)
14. Manalo D.L., Bolivar J.K.G., Ermino K.I.T., et al. Development of a SYBR Green-Based Real-Time PCR Assay to Detect *Oncomelania hupensis quadrasi* DNA in Environmental Water Samples. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2025;10(5):140. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10050140>
15. Forootan A., Sjöback R., Björkman J., et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*. 2017 Apr 29;12:1–6. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001

16. GOST R ISO 5725-1-2002 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1. General principles and definitions*. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/2995/> (accessed 25.09.2025) (in Russian)
17. Spezia P.G., Focosi D., Baj A., et al. TTV and other anelloviruses: The astonishingly wide spread of a viral infection. *Asp Mol Med*. 2023;1: None. doi: 10.1016/j.amolm.2023.100006
18. Podutov V., Baranov O., Voropaev E. (2007) *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk: Unipol. (in Russian)
19. GOST R ISO 5725-6-2002 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 6. Use in practice of accuracy values*. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/2800/> (accessed 25.09.2025) (in Russian)
20. Kamyshnikov V.S. (2009) *Handbook of Clinical and Biochemical Research and Laboratory Diagnostics*. Moscow: MEDpress-inform. (in Russian)
21. Umemneku Chikere C.M., Wilson K., Graziadio S., et al. Diagnostic test evaluation methodology: A systematic review of methods employed to evaluate diagnostic tests in the absence of gold standard – an update. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223832>
22. Hu Y.W., Al-Moslih M.I., Al Ali M.T., et al. Molecular detection method for all known genotypes of TT virus (TTV) and TTV-like viruses in thalassemia patients and healthy individuals. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):3747–54. doi: 10.1128/JCM.43.8.3747-3754.2005
23. Osipkina O.V., Voropaev E.V., Mitsura V.M., et al. Comparison of different DNA detection options for TTV, TTMDV, and TTMV viruses. *Health and Ecology Issues*. 2022;19(1):102–108. (In Russ.) <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2022-19-1-13>
24. Irengue L.M., Robert A., Gala J.L. Quantitative assessment of human beta-globin gene expression in vitro by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2395–6. doi: 10.1373/clinchem.2005.056630
25. Jacquet N., Wurtzer S., Darracq G., et al. Effect of concentration on virus removal for ultrafiltration membrane in drinking water production. *Journal of Membrane Science*. 2021;634:119417. ISSN 0376-7388. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2021.119417>
26. Spezia P.G., Carletti F., Novazzi F., et al. Torquetenovirus Viremia Quantification Using Real-Time PCR Developed on a Fully Automated, Random-Access Platform. *Viruses*. 2024 Jun 15;16(6):963. doi: 10.3390/v16060963



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.004>
УДК 618.146-002-007:17-093/-098:579.864



Логинова О.П.¹✉, Шевченко Н.И.¹, Гасич Е.Л.²

¹ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Беларусь

² Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Состояние микробиоценоза влагалища и оценка функциональной активности резидентной микробиоты у женщин при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Логинова О.П. – концепция и дизайн исследования, обзор публикаций по теме статьи, сбор материала, анализ и статистическая обработка результатов и их изложение, работа с иллюстративным материалом, обсуждение и выводы, библиография, написание текста статьи; Шевченко Н.И. – редактирование рукописи; Гасич Е.Л. – критическое обсуждение текста рукописи и одобрение окончательного варианта для опубликования.

Благодарности: авторы выражают благодарность врачу – акушеру-гинекологу консультативной поликлиники Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека Медведевой Ж.Н., врачу – акушеру-гинекологу Гомельской городской клинической поликлиники № 3 Конаковой Д.И., врачу клинической лабораторной диагностики лаборатории клеточных технологий Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека Тетеревой Н.В.

Подана: 09.08.2025

Принята: 10.11.2025

Контакты: loginovaolga81@mail.ru

Резюме

Введение. Рак шейки матки (РШМ) по-прежнему ежегодно уносит жизни более 300 000 женщин. В исследованиях последних лет все чаще изучается состояние микробиоценоза влагалища при дисплазиях шейки матки и обсуждается корреляция между резидентной микробиотой влагалища и предопухолевой патологией шейки матки.

Цель. Провести оценку состояния микробиоценоза влагалища и функциональной активности резидентной микробиоты у женщин при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии.

Материалы и методы. Объектом исследования явились 78 женщин репродуктивного возраста (18–49 лет). Первую, контрольную, группу (n=39) составили женщины с нормоцитограммой; вторую, основную, группу (n=39) – женщины с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (ЦИН). У всех пациенток был отрицательный результат ПЦР на вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) в соскобах из цервикального канала шейки матки. Выполнено микробиологическое исследование мазков из заднего свода влагалища, определен уровень pH влагалищного отделяемого, проведена оценка состояния микробиоценоза влагалища, изучен видовой состав лактобактерий, продукция ими перекиси водорода, антагонистическая активность и способность формировать биопленку.

Результаты. В группе с дисплазией ШМ в 87,2% (n=34) случаев микробиоценоз влагалища соответствовал критериям дисбиоза. У женщин с нормоцитограммой значимо чаще выявлен нормоценоз (69,2%) в сравнении с группой с дисплазией ШМ ($p<0,001$). Значения pH влагалищного отделяемого находились в пределах нормальных значений (4,0 [4,0; 4,0]) в группе с нормоцитограммой и были значимо повышены (5,0 [4,0; 6,0]) в группе с цервикальной дисплазией ($p=0,001$). В группе с дисплазией чаще встречались *L. acidophilus* (23,1%), *L. gasseri* (23,1%), *L. plantarum* (23,1%). В группе женщин с нормоцитограммой преобладали следующие виды лактобактерий: *L. crispatus* (35,9%), *L. gasseri* (25,6%), *L. plantarum* (17,9%). У женщин с цервикальной дисплазией практически все изоляты лактобактерий (92,3%) не продуцировали перекись водорода и обладали низкой способностью формировать биопленку (синтезировать основное вещество – 69,2%, накапливать биомассу – 46,2%), у лактобактерий этой группы была снижена антагонистическая активность по отношению ко всем тест-штаммам. Были выявлены факторы, ассоциированные с дисплазией шейки матки, наличие которых позволит сформировать группы риска развития предопухолевой патологии среди женщин для динамического наблюдения.

Заключение. Получены новые результаты о состоянии микробиоценоза влагалища и особенностях функций резидентной микрофлоры влагалища при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии. Установлены факторы, ассоциированные с ВПЧ-негативной цервикальной дисплазией. К ним следует отнести: дисбиоз влагалища, повышенный уровень pH влагалищного отделяемого, снижение антагонистической активности лактобактерий по отношению к различным патогенам, отсутствие продукции перекиси водорода и низкую способность лактобактерий к биопленкообразованию. Понимание роли вагинальных лактобактерий и их функций при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии открывает новые возможности предупреждения развития РШМ, персонализированного подхода к каждой женщине, проведения динамического наблюдения и коррекции состояния микробиоценоза влагалища.

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, лактобактерии, функции лактобактерий, цервикальная дисплазия, вирус папилломы человека



Lohinava V.¹✉, Shevchenko N.¹, Gasich E.²

¹ Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

² Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of the Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

State of Vaginal Microbiocenosis and Functional Activity of Resident Microbiota Assessment in Women with HPV-Negative Cervical Dysplasia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Lohinava O. – study concept and design, review of publications on the topic of the article, material collection, results analysis and statistical processing and their presentation, visualization, discussion and conclusions, bibliography, text writing; Shevchenko N. – editing; Gasich E. – critical discussion of the text and approval of the final version for publication.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the obstetrician-gynecologist of the outpatient clinic of the Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology Medvedeva Zh., the obstetrician-gynecologist of the Gomel City Clinical Polyclinic No. 3 Konakova D., and the doctor of clinical laboratory diagnostics of the laboratory of cell technologies of the Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology Tetereva N.

Submitted: 09.08.2025

Accepted: 10.11.2025

Contacts: loginovaolga81@mail.ru

Abstract

Introduction. Cervical cancer (CC) continues to kill over 300,000 women annually. Recent studies have increasingly examined the state of the vaginal microbiocenosis in cervical dysplasia and discussed the correlation between resident vaginal microbiota and precancerous cervical pathology.

Purpose. To assess the state of the vaginal microbiocenosis and the functional activity of the resident microbiota in women with HPV-negative cervical dysplasia.

Materials and methods. The study involved 78 women of reproductive age (18–49 years). The first (comparison) group (n=39) included women with normocytogram, the second group (n=39) included women with cervical intraepithelial dysplasia (CIN). All patients had negative PCR results for high-risk human papillomavirus (HPV) in scrapings from the cervical canal of the cervix. A microbiological study of smears from the posterior vaginal fornix was performed, the pH level of vaginal discharge was determined, the state of the vaginal microbiocenosis was assessed, and the species composition of lactobacilli, their production of hydrogen peroxide, antagonistic activity and ability to form a biofilm were studied.

Results. In the group with cervical dysplasia, vaginal microbiocenosis met the criteria of dysbiosis in 87.2% (n=34) of cases. Normocoenosis was detected significantly more often in women with normocytograms (69.2%) compared to the group with cervical dysplasia ($p<0.001$). The pH values of vaginal discharge were within the normal range (4.0 [4.0; 4.0]) in the group with normocytograms and were significantly increased (5.0 [4.0; 6.0]) in the group with cervical dysplasia ($p=0.001$). *L. acidophilus* (23.1%), *L. gasseri* (23.1%), and *L. plantarum* (23.1%) were more common in the group with dysplasia. In the group of women with normocytograms, the following types of lactobacilli prevailed: *L. crispatus* (3.9%), *L. gasseri* (25.6%), and *L. plantarum* (17.9%). In women with cervical dysplasia, almost all lactobacilli isolates did not produce hydrogen peroxide (92.3%) and had a low

ability to form biofilms (to synthesize the main substance in 69.2%, and to accumulate biomass in 46.2%); lactobacilli of this group had reduced antagonistic activity in relation to all test strains. Factors associated with cervical dysplasia were identified, the presence of which will allow establishing precancerous risk groups among women for case follow-up.

Conclusion. Thus, we have obtained new results about the state of the vaginal microbiocenosis and the features of the functions of the resident vaginal microflora in HPV-negative cervical dysplasia. We have established factors associated with HPV-negative cervical dysplasia. These include: vaginal dysbiosis, increased pH of vaginal discharge, decreased antagonistic activity of lactobacilli against various pathogens, lack of hydrogen peroxide production, and low ability of lactobacilli to form biofilms. Understanding the role of vaginal lactobacilli and their functions in HPV-negative cervical dysplasia opens up new opportunities for preventing cervical cancer, personalizing approach to each woman, case follow-up, and correcting vaginal microbiocenosis state.

Keywords: vaginal microbiocenosis, lactobacilli, lactobacilli functions, cervical dysplasia, human papillomavirus

■ ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире предпринимаются многочисленные усилия по снижению числа заболевших раком шейки матки (РШМ), включая улучшение скрининга заболевания и программ вакцинации против вируса папилломы человека (ВПЧ). Тем не менее РШМ по-прежнему ежегодно уносит жизни более 300 000 женщин. Хорошо известно, что ВПЧ является доказанным этиологическим фактором развития предопухолевой патологии шейки матки и РШМ [1, с. 890]. Однако лишь небольшой процент инфекций, вызванных ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР), прогрессирует до предрака и рака шейки матки [2, с. 1]. До конца не понятно, почему у одних женщин происходит элиминация вируса, а у других он переходит в интегративную форму и вызывает развитие предопухолевой патологии шейки матки (ШМ). Однозначного ответа на этот вопрос не получено. За последние 3 десятилетия во многих эпидемиологических исследованиях изучались факторы риска, связанные с персистенцией ВПЧ ВКР и развитием РШМ, включая иммуносупрессию, встречаемость инфекций, передающихся половым путем, рискованное сексуальное поведение и курение [3, с. 2] и др. В проведенных ранее исследованиях была показана связь этих факторов риска с развитием РШМ.

В последние годы все чаще изучается состояние микробиоценоза влагалища при дисплазиях шейки матки и обсуждается корреляция между резидентной микробиотой влагалища и предопухолевой патологией ШМ [4, с. 1]. Остается открытым вопрос об изменениях состояния микробиоценоза влагалища при дисплазии у ВПЧ-положительных и ВПЧ-негативных пациенток. Исследователи не могут решить, что первично: является ли дисбиоз влагалища фактором, способствующим формированию патоморфологических изменений в цервикальном эпителии, инфицированном ВПЧ, или изменения микрофлоры способствуют инфицированию ВПЧ, приводят к длительной персистенции вируса и запускают канцерогенез [5, с. 25].



В микробиоценозе влагалища в норме преобладают *Lactobacillus* spp. Экосистема влагалища человека связана с низким микробным разнообразием. В норме доминируют лактобактерии (>90%), среди которых ключевыми являются несколько видов *Lactobacillus*: *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* и *L. iners* [6, с. 159]. Лактобактерии поддерживают pH влагалища на уровне 3,8–4,5 за счет синтеза молочной кислоты и перекиси водорода [7, с. 1]. *Lactobacillus* spp. выполняют защитную функцию на слизистых влагалища, формируя колонизационную резистентность. Колонизационная резистентность влагалища – важнейший механизм предупреждения возникновения инфекции [8, с. 109]. Здоровая цервикагинальная микробиота поддерживает целостность эпителиального барьера шейки матки и модулирует иммунную систему слизистой оболочки. Нарушения состава микробиоты сопровождаются изменениями микробных метаболитов, которые вызывают местное воспаление, повреждают эпителиальный и иммунный барьер шейки матки, а также повышают восприимчивость к инфекциям, передающимся половым путем, в том числе и к ВПЧ [7, с. 1; 9, с. 1]. Что касается инфекций ВПЧ, то помимо того, что они способствуют их приобретению, обычно считается, что окислительный стресс, возникающий в результате микробного дисбиоза, также способствует последующему прогрессированию ВПЧ-положительных неопластических поражений [10, с. 10].

Лактобактерии, продуцирующие перекись водорода, при взаимодействии с пероксидазой цервикальной слизи и галоидными соединениями подавляют рост и размножение патогенных бактерий. Лактобактерии способны синтезировать аминокислоты, лизоцим, бактериоцины, которые также обладают антагонистической активностью в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры влагалища [11, с. 154]. Способность лактобактерий формировать биопленки *in vivo* представляет собой мощный защитный фактор, обеспечивающий стабильную колонизацию вагинального эпитопа и создающий физический барьер против инвазии и чрезмерного размножения патогенных микроорганизмов [12, с. 433].

В связи с этим анализ вагинальной микробиоты и ее свойств важен для понимания патогенетических механизмов возникновения дисплазии шейки матки, для выявления факторов, ассоциированных с цервикальной дисплазией, а также может служить дополнительным инструментом оценки риска предопухолевых состояний.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести оценку состояния микробиоценоза влагалища и функциональной активности резидентной микробиоты у женщин при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явились 78 женщин репродуктивного возраста (18–49 лет). Средний возраст участниц исследования – 35 ± 7 лет. Контингент женщин был разделен на 2 группы в зависимости от результатов цитологического исследования соскобов цервикального канала шейки матки (ШМ). Первую, контрольную, группу ($n=39$) составили женщины с нормоцитогаммой, вторую группу ($n=39$) – женщины с цервикальной интраэпителиальной дисплазией. У пациенток в обеих группах был отрицательный результат ПЦР на ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) в соскобах из цервикального канала шейки матки.

У женщин получено письменное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Материалом для исследования послужили мазки из заднего свода влагалища. Всем пациенткам было выполнено микробиологическое исследование клинических образцов с полуколичественным посевом на набор дифференциально-диагностических сред (среда Эндо, маннит-желточно-солевой агар, энтерококк агар, Сабуро с хлорамфениколом, 5% кровяной агар, MRS-агар). Идентификацию выросших микроорганизмов проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция). Лактобактерии идентифицировали с использованием карт ANC и стрипов api50CHL (BioMerieux, Франция). Для контроля качества идентификации лактобактерий применялся контрольный штамм *L. acidophilus* ATCC 4356. Состояние микробиоценоза влагалища оценивали в зависимости от числа выросших микроорганизмов. Вариант микробиоценоза, при котором количество лактобактерий было более 10^7 КОЕ/мл, *Candida* spp. – менее 10^4 КОЕ/мл, условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) – менее 10^5 КОЕ/мл, рассценивали как абсолютный нормоценоз, при содержании *Candida* spp. более 10^4 КОЕ/мл, лактобактерий 10^5 – 10^6 КОЕ/мл – как умеренный дисбиоз, а при снижении содержания лактобактерий менее 10^5 КОЕ/мл или при полном их отсутствии, УПМ более 10^5 КОЕ/мл – как выраженный дисбиоз. Во всех образцах отделяемого влагалища выполнено определение pH с использованием индикаторных полосок (Macherey-Nagel, Германия).

Определена функциональная активность штаммов выросших лактобактерий. Оценена способность лактобактерий продуцировать перекись водорода, антагонистическая активность и способность формировать биопленку. Для определения продукции перекиси водорода лактобактериями использовался разработанный в лаборатории метод с добавлением к суточной культуре лактобактерий раствора серной кислоты и раствора крахмально-йодистого калия*. Через 10 мин наблюдали за изменением цвета раствора в пробирке. Появление в ней отдельных пятен синего цвета или посинения всего бульона указывало на продукцию перекиси водорода лактобактериями – положительный результат. Если цвет бульона в пробирке не изменялся, то результат оценивали как отрицательный. Для контроля качества определения продукции перекиси водорода использовался контрольный штамм *L. acidophilus* ATCC 4356, который продуцировал H_2O_2 .

Для определения антагонистической активности применяли метод агаровых блоков [13, с. 42]. В качестве тест-штаммов, в отношении которых определяли антагонистическую активность, использовали контрольные штаммы из американской коллекции: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Результат учитывали, измеряя зону задержки роста в миллиметрах, и соотносили с диаметром зон задержки роста для контрольного штамма *L. acidophilus* ATCC 4356 (*E. coli* – 12 мм, *S. aureus* – 12 мм, *E. faecalis* – 13 мм, *P. aeruginosa* – 14 мм). В случае чувствительности последних к антибактериальному веществу продуцента

* Логинова О.П. Способ определения продукции перекиси водорода лактобактериями / ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». № 1338 от 20.03.2024. URL: <https://www.rcrm.by/science/rezultaty-nauchno-issledovatel'skoy-deyatelnosti/>.



вокруг агаровых блоков образовывалась зона задержки роста. Чем больше выделялось антибактериального вещества лактобактериями, тем больше был диаметр зоны задержки роста вокруг агарового блока с лактобактериями. Если зоны задержки роста тест-штамма лактобактерий превышали таковые для контрольного штамма, то антагонистическая активность считалась высокой, если зоны задержки роста были меньше – низкой.

Оценку фенотипической способности формировать биопленку выполняли по разработанному методу, за основу взят патент на изобретение Республики Беларусь № 20326 [14] и модифицирован для лактобактерий. Для этого получали 48-часовую культуру лактобактерий в MRS-бульоне мутностью 2McFarland. По 100 мкл полученной суспензии инокулировали в лунки плоскодонного планшета в дублях для каждого штамма лактобактерий, параллельно в 2 лунки вносили суспензию штамма *L. acidophilus* ATCC 4356. В половину лунок добавляли по 50 мкл 0,1% водного раствора красителя Congo Red, планшет заклеивали адгезивной пленкой и инкубировали его при температуре 37 °C в анаэробных условиях 72 ч. Через 72 ч из лунок удаляли планктонные клетки и трехкратно промывали образовавшуюся биопленку фосфатным буферным раствором, затем в лунки без Congo Red добавляли 50 мкл 0,1% раствора красителя генцианвиолета и окрашивали биопленку 10 мин при комнатной температуре, после чего промывали ее фосфатным буферным раствором, планшет высушивали. Для окраски основного вещества (ОВ) биопленки использовали Конго красный, для окраски биомассы (БМ) – генцианвиолет. Во все лунки добавляли по 200 мкл 96% этилового спирта для элюирования красителей из лунок. Результаты учитывали с использованием спектрофотометра, определяли значения оптической плотности элюата Congo Red при 490 нм и элюата генцианвиолета при 540 нм для контрольного штамма и для клинических штаммов лактобактерий. Результат выражали в единицах оптической плотности (OD). Контролем (ODк) служили лунки, в которые добавляли только MRS-бульон без лактобактерий. Отсутствию способности к образованию ОВ соответствовали значения $OD \leq 0,053$ ед. для экстрактов Congo Red / этанол и накоплению БМ – $OD \leq 0,071$ ед. для экстрактов генцианвиолет/этанол. Низкая способность накапливать основное вещество определялась пределами OD от 0,053 до 0,106 ед., умеренная – 0,106 до 0,213 ед., выраженная – $> 0,213$ ед. Низкая способность накапливать БМ определялась пределами OD от 0,0713 до 0,142 ед., умеренная – от 0,142 до 0,284 ед., выраженная – $> 0,284$ ед.

Количественные показатели исследования представлены медианой и квартилями в виде Me [Q25; Q75]. Сравнение количественных показателей проводилось с помощью критерия Манна – Уитни, при одновременном сравнении нескольких подгрупп применялась поправка Холма на множественные сравнения. Качественные показатели представлены частотами и процентами в группе. При исследовании таблиц сопряженности использовался критерий хи-квадрат, в случае нарушения предположений, лежащих в основе критерия хи-квадрат, применялся точный критерий Фишера. Все расчеты проводились в статистическом пакете R, версия 4.1 (R Core Team (2023)), и офисном пакете Excel 10. Уровень ошибки первого рода α был принят равным 0,05 для статистического вывода.

Все исследования выполнялись в лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» в рамках финансируемого проекта БРФФИ «Изучить функциональные особенности резидентной микробиоты влагилица при различной степени тяжести

предопухолевых поражений шейки матки у ВПЧ-положительных женщин репродуктивного возраста Гомельской области», № гос. регистрации 20221047 от 04.07.2022.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследований оценки состояния микробиоценоза влагалища показали значимые отличия между группами женщин с патологией и без патологии ШМ. Нарушение баланса микрофлоры влагалища установлено в 87,2% (n=34) в группе с дисплазией, причем в 66,7% (n=26) случаев был определен выраженный дисбиоз и только у 12,8% (n=5) пациенток состояние микрофлоры соответствовало нормоценозу. Напротив, в группе без патологии ШМ состояние микробиоценоза влагалища в более чем половине случаев – 69,2% (n=27) соответствовало критериям нормоценоза и выраженный дисбиоз в этой группе не выявлялся, умеренный дисбиоз отмечен в 30,8% (n=12). Следовательно, в группе с дисплазией ШМ зафиксировано преобладание изменений нормальной микрофлоры влагалища, соответствующей критериям дисбиоза. В группе пациенток с нормоцитогаммой значимо чаще выявлен нормоценоз в сравнении с группой женщин с дисплазией ШМ (p<0,001) (табл. 1).

Значения pH влагалищного отделяемого находились в пределах нормальных значений (4,0 [4,0; 4,0]) в группе с нормоцитогаммой и были значимо повышены (5,0 [4,0; 6,0]) в группе с цервикальной дисплазией (p=0,001). Установлено, что чаще уровень pH отличался от нормы при наличии дисбиоза. В группе пациенток с дисплазией уровень pH при умеренном и выраженном дисбиозе был значимо чаще изменен, чем у женщин контрольной группы. Значимые различия в уровнях pH были отмечены и у женщин с дисплазией и нормоцитогаммой при нормоценозе (табл. 2).

Таблица 1
Состояние микробиоценоза влагалища в исследуемых группах
Table 1
Vaginal microbiocenosis state in the studied groups

Состояние микробиоценоза	Дисплазия	Нормоцитогамма	p
	n (%)		
Нормоценоз	5 (12,8)	27 (69,2)	<0,001
Умеренный дисбиоз	8 (20,5)	12 (30,8)	
Выраженный дисбиоз	26 (66,7)	0	

Таблица 2
Уровень pH в зависимости от выраженности изменений микробиоценоза влагалища в группах сравнения
Table 2
pH level depending on the severity of changes in the vaginal microbiocenosis in the study groups

Состояние микробио- ценоза	Уровень pH				p с поправ- кой на множе- ственные сравнения
	Дисплазия n=39		Нормоцитограмма n=39		
	n	Me [Q25; Q75]	n	Me [Q25; Q75]	
Нормоценоз	5	6,0 [4,0; 6,0]	27	4,0 [4,0; 4,0]	0,004
Умеренный дисбиоз	8	5,5 [5,0; 7,2]	12	4,0 [4,0; 4,6]	0,014
Выраженный дисбиоз	26	5,0 [4,0; 5,8]	0	–	–



В результате проведенных микробиологических исследований в группе женщин с нормоцитогаммой получен рост 39 (100%) штаммов лактобактерий. В группе женщин с дисплазией рост лактобактерий регистрировался в 3 раза реже и было получено 13 (33,3%) изолятов. В целом видовое разнообразие лактобактерий в исследуемых группах значимо не различалось ($p=0,264$). Однако частотный анализ их встречаемости позволил установить, что лидирующие позиции в обеих группах принадлежали разным видам лактобактерий. В группе пациенток с дисплазией встречались с одинаковой частотой (по 23,1% ($n=3$)) *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, а *L. crispatus* зарегистрирован лишь в 1 клиническом образце (7,7%). Напротив, в группе женщин с нормоцитогаммой штамм *L. crispatus* идентифицирован в 35,9% ($n=14$) случаев, *L. gasseri* и *L. plantarum* определялись у 25,6% ($n=10$) и 17,9% ($n=7$) пациенток соответственно.

Важно учитывать, что лактобактерии участвуют в обеспечении барьерной функции и поддержании баланса микрофлоры влагалища, в связи с чем у полученных штаммов была изучена их антагонистическая активность (АА). Результаты, полученные в ходе исследования, продемонстрировали статистически значимые различия АА лактобактерий в исследуемых группах ($p<0,001$). В основной группе лактобактерии практически не демонстрировали АА по отношению ко всем используемым тест-штаммам (табл. 3). В контрольной группе, наоборот, изоляты лактобактерий обладали высокой АА. Лишь 12,8% штаммов проявляли низкую активность к *E. faecalis*, 5,1% – к *P. aeruginosa*, 2,6% – к *S. aureus*. В отношении *E. coli* все штаммы лактобактерий в группе с нормоцитогаммой проявляли высокую АА.

Необходимо акцентировать внимание на том, что лактобактерии обладали низкой АА в группе с дисплазией ШМ по отношению к *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* и *P. aeruginosa*. Средние значения зон задержки роста всех вышеперечисленных микроорганизмов были значимо ниже в сравнении с таковыми для тест-штаммов в группе с нормоцитогаммой ($p<0,001$). Выделенные изоляты лактобактерий проявляли наибольшую АА по отношению к *P. aeruginosa*, *E. coli* и в группе женщин с цервикальной дисплазией, и в группе с нормоцитогаммой – $11,2\pm5,8$ мм и $18,2\pm2,4$ мм; $9,6\pm6,3$ мм и $19,0\pm4,2$ мм соответственно. Наименьшую активность лактобактерии проявляли по отношению *E. faecalis* (рис. 1).

Таблица 3

Антагонистическая активность штаммов лактобактерий по отношению к *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853

Table 3

Antagonistic activity of lactobacilli strains against *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853

Антагонистическая активность, мм*	Дисплазия n=13	Нормоцитогамма n=39	p
	n (%)		
<i>E. coli</i> , <12	7 (53,8)	0	<0,001
<i>S. aureus</i> , <12	7 (53,8)	1 (2,6)	<0,001
<i>E. faecalis</i> , <13	10 (76,9)	5 (12,8)	<0,001
<i>P. aeruginosa</i> , <14	9 (69,2)	2 (5,1)	<0,001

Примечание: * размер зоны задержки роста для штамма *L. acidophilus* ATCC 4356 в мм, ниже которых антагонистическая активность была низкой; ATCC – Американская коллекция типовых культур.

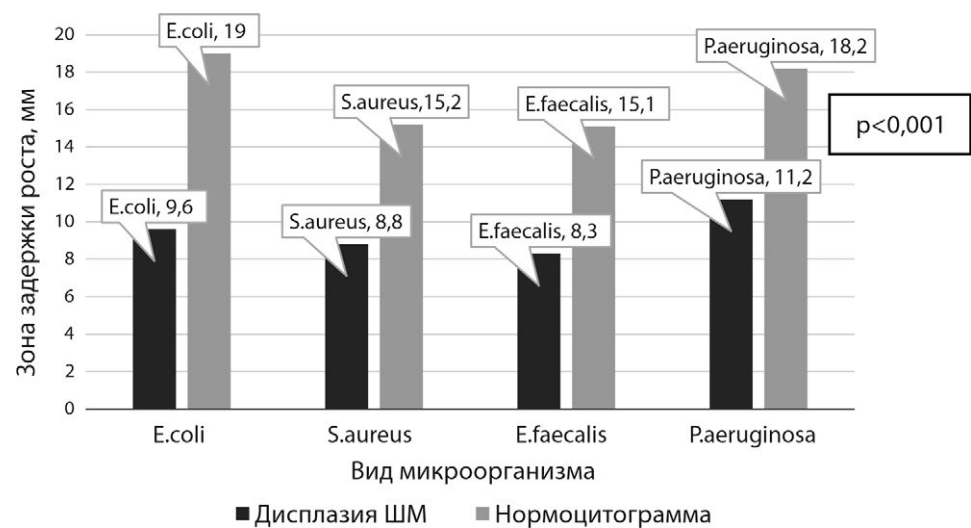


Рис. 1. Диаметр зон ингибирования роста тест-штаммов в группах при определении антагонистической активности, мм (M)
Fig. 1. Diameter of growth inhibition zones of test strains in groups when determining antagonistic activity, mm (M)

Важным свойством лактобактерий является способность продуцировать перекись водорода. Перекись водорода подавляет рост грамотрицательных, грамположительных факультативных и облигатных анаэробов, в том числе *E. coli*, *G. vaginalis*, *Mobiluncus* и др. Вместе с ионами хлора и миелопероксидазой перекись водорода участвует в образовании во влагалище токсичных окислителей, обладающих бактерицидным действием [15, с. 66]. Снижение способности лактобактерий продуцировать перекись водорода повышает риск инфицирования условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. В проведенном исследовании в контрольной группе все штаммы продуцировали перекись водорода (табл. 4). В отличие от группы женщин с нормоцитограммой, в группе пациенток с дисплазией только 1 штамм продуцировал H₂O₂ (7,7%), 92,3% (n=12) штаммов не обладали этой способностью. Различия в группах были статистически значимыми (p<0,001).

Формирование биопленки лактобактериями является одним из факторов колонизационной резистентности. На поверхности слизистой влагалища создается физиологический барьер из лактобактерий, препятствующий адгезии патогенных

Таблица 4
Продукция перекиси водорода изолятами лактобактерий в исследуемых группах
Table 4
Production of hydrogen peroxide by isolates of Lactobacteria in the study groups

Продукция перекиси водорода	Дисплазия n=13	Нормоцитограмма n=39	p
	n (%)		
Да	1 (7,7)	39 (100)	<0,001
Нет	12 (92,3)	0	



микроорганизмов [12, с. 433]. На основании оценки биопленкообразования выделенными нами изолятами лактобактерий установлено, что в группе с дисплазией способность накапливать биомассу (БМ) была ниже в 1,8 раза и основное вещество (ОВ) – в 2,5 раза по сравнению с изолятами лактобактерий, выделенными от женщин с нормоцитогаммой. Оптическая плотность (OD) при дисплазии ШМ экстракта красителя Конго красного была статистически значимо ниже в 2,5 раза и экстракта генцианвиолета – в 1,84 раза по сравнению с аналогичными показателями у женщин контрольной группы (табл. 5). Низкая интенсивность накопления основного вещества указывает на снижение персистентного потенциала и защитных функций лактобактерий в группе с дисплазией ШМ.

При оценке интенсивности биопленкообразования установлено, что в группе пациенток с дисплазией ШМ лактобактерии чаще обладали низкой способностью синтезировать ОВ (69,2%) и накапливать БМ (46,2%). У 23,1% лактобактерий этой группы способность накапливать БМ отсутствовала. В группе с нормоцитогаммой изоляты лактобактерий, напротив, в 66,7% случаев обладали выраженной способностью формировать ОВ. Способность накапливать БМ была умеренной у 43,6% штаммов и выраженной – у 23,1% изолятов лактобактерий этой группы (рис. 2).

Таблица 5
Способность формировать биопленку изолятами лактобактерий в исследуемых группах
Table 5
Ability to form biofilm by lactobacilli isolates in the study groups

Способность формировать биопленку	Дисплазия	Нормоцитогамма	p
	Оптическая плотность экстрагируемого красителя Me [Q25; Q75]		
Конго красный (ОВ)	0,095 [0,063; 0,137]	0,233 [0,176; 0,322]	<0,001
Генцианвиолет (БМ)	0,100 [0,084; 0,158]	0,184 [0,114; 0,277]	0,029

Примечание: ОВ – основное вещество, БМ – биомасса.

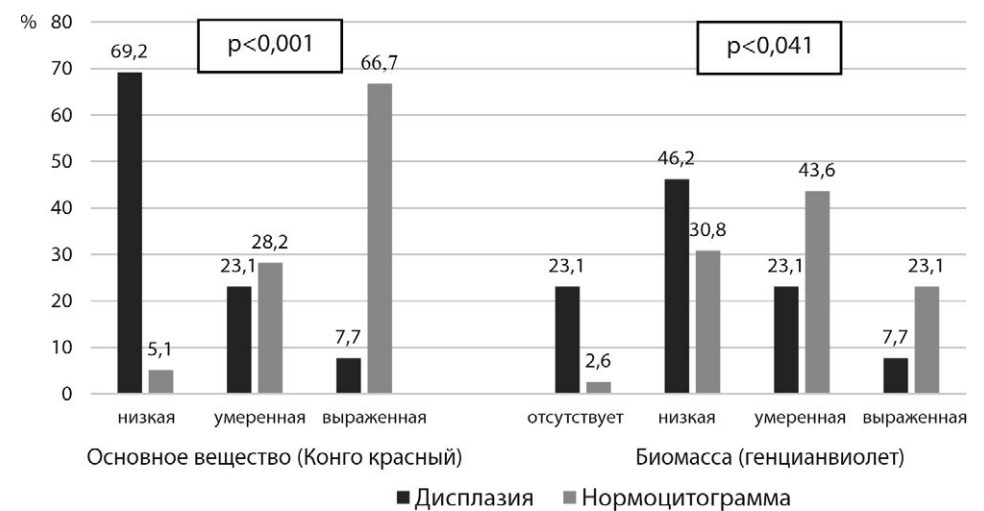


Рис. 2. Оценка интенсивности биопленкообразования лактобактериями в исследуемых группах
Fig. 2. Evaluation of the intensity of biofilm formation by lactobacilli in the study groups

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании продемонстрировано снижение доминирования лактобактерий в микробиоценозе влагалища у 87,2% женщин с цервикальной дисплазией. Результатом этого является развитие дисбактериоза влагалища и снижение колонизационной резистентности. Аналогичные результаты получены Kovachev S.M. Автор показал, что у 23 (71,9%) женщин с РШМ выявлены нарушения микробиоты влагалища со снижением количества лактобактерий [16, с. 1]. Снижение числа лактобактерий может оказывать существенное влияние на возникновение и развитие РШМ [17, с. 2237]. Дисбиоз цервикагинальной микрофлоры в сочетании с изменениями в микробном составе, метаболитах и иммунном микроокружении повреждает барьер и эпителиальные клетки, а также нарушает иммунный ответ против инфекций ВПЧ [18, с. 8–9], что в итоге приводит к развитию РШМ [19, с. 7]. Некоторыми авторами показано, что цервикагинальные лактобациллы могут оказывать прямое цитотоксическое действие на клетки РШМ [20, с. 236]. Недавние исследования в Швеции продемонстрировали, что вагинальный дисбиоз, характеризующийся потерей доминирования *Lactobacillus* и увеличением микробного разнообразия, связан не только с повышенным риском заболеваний половых путей, включая бактериальный вагиноз, аэробный вагинит, вульвовагинальный кандидоз, инфекции, передающиеся половым путем, но и с осложнениями беременности, такими как преждевременные роды [21].

Известно, что лактобактерии составляют более 95% всей комменсальной экосистемы влагалища и в норме поддерживают pH от 3,8 до 4,5 благодаря выработке молочной кислоты [6, 7]. При уменьшении количества лактобактерий в группе с дисплазией ШМ отмечается увеличение pH среды вследствие снижения выработки молочной кислоты и перекиси водорода. D.E. O'Hanlon и соавт. показали, что в микробиоценозе влагалища женщин, у которых доминировали лактобациллы, концентрация молочной кислоты была обратно пропорциональна pH, что указывает на важную роль молочной кислоты в поддержании кислой среды влагалища [22, с. 4–5], которая действует как антимикробное соединение против бактериальных, грибковых и вирусных патогенов [23, с. 4].

Хотя в выполненном исследовании видовой состав лактобактерий в группах значимо не различался, была отмечена их разная частотная представленность в исследуемых группах. Например, в группе женщин с нормоцитогаммой чаще встречались *L. crispatus*, а при дисплазии они обнаружены только в 1 клиническом образце. Многие авторы при оценке разнообразия лактобактерий приводят данные, свидетельствующие о том, что лидерование *L. crispatus* характерно для нормоценоза, они чаще отмечаются в биотопе здоровых женщин [24, с. 64], оказывая ингибирующее действие на клетки РШМ [25, с. 1]. Nunn и соавторы обнаружили, что преобладание *L. crispatus* и относительно высокие уровни D-молочной кислоты оказывают влияние на повышение вязкости цервикагинальной слизи, что способствует захвату вирусных частиц при вирусных урогенитальных инфекциях [26, с. 3].

Результаты проведенной нами оценки функций лактобактерий показали значимые изменения в группе женщин с дисплазией шейки матки. В этой группе отмечено снижение протективных свойств лактобактерий: недостаточная продукция перекиси водорода, сниженная антагонистическая активность и способность формировать биопленку, что характеризует сниженную колонизационную резистентность



по отношению к бактериальным и вирусным возбудителям. В группе с нормоцитотграммой, напротив, все свойства лактобактерий были реализованы в полной мере. Полученные нами результаты совпадают с ранее опубликованными исследованиями А.С. Исаевой и соавт., показавшими, что при нормоценозе 96,7% изолятов продуцировали перекись водорода, при мезоценозе 30% изолятов теряли такую способность, а при бактериальном вагинозе (дисбиозе) почти половина изолятов лактобацилл не продуцировали перекись водорода [24, с. 63].

В норме *Lactobacillus* spp. доминируют во влагалищном биотопе, поддерживают динамическое равновесие и составляют основу микрофлоры. В случае нарушения этого баланса количество лактобацилл уменьшается с последующим угнетением защитных функций, разрушается кислая среда влагалища, наступает гипоксия, снижается уровень местного иммунитета, ослабевает противоопухолевый эффект и повышается вероятность возникновения поражений ШМ [27, с. 2].

Таким образом, нами установлены принципиально важные отличия состояния микробиоценоза влагалища и функций резидентной микрофлоры у женщин при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии по сравнению с таковыми у женщин с нормоцитотграммой. Проведенный анализ показал, что для женщин с ВПЧ-негативной цервикальной дисплазией был характерен дисбиоз влагалища, повышенный уровень pH влагалищного отделяемого, снижение антагонистической активности лактобактерий по отношению к различным патогенам, отсутствие продукции перекиси водорода и низкая способность лактобактерий к биопленкообразованию. Полученные данные свидетельствуют о том, что микробиота может играть определенную роль в создании проонкогенной среды у женщин с дисплазией.

Анализ вагинальной микробиоты, в частности его основного микробного компонента – лактобактерий и их функций, может служить дополнительным инструментом оценки риска и предупреждения развития РШМ при ВПЧ-негативной цервикальной дисплазии, а также персонализированного подхода к каждой женщине, проведения динамического наблюдения и коррекции состояния микробиоценоза влагалища. Несомненна важность применения предиктивного, персонализированного и профилактического подходов к ведению каждой пациентки для предотвращения развития предопухолевой патологии ШМ.

■ ВЫВОДЫ

1. В группе женщин с дисплазией ШМ в 87,2% (n=34) случаев микробиоценоз влагалища соответствовал критериям дисбиоза. У женщин с нормоцитотграммой значимо чаще выявлен нормоценоз (69,2%) в сравнении с группой пациенток с дисплазией ШМ ($p<0,001$). Значения pH влагалищного отделяемого находились в пределах нормальных значений (4,0 [4,0; 4,0]) в группе с нормоцитотграммой и были значимо повышены (5,0 [4,0; 6,0]) в группе с цервикальной дисплазией ($p=0,001$).
2. Видовое разнообразие лактобактерий в исследуемых группах значимо не различалось ($p=0,264$). Однако лидирующие виды лактобактерий различны. В группе с дисплазией чаще встречались *L. acidophilus* (23,1%), *L. gasseri* (23,1%), *L. plantarum* (23,1%). В группе женщин с нормоцитотграммой преобладали *L. crispatus* (35,9%), *L. gasseri* (25,6%), *L. plantarum* (17,9%).

3. В группе с дисплазией шейки матки антагонистическая активность была снижена по отношению ко всем тест-штаммам (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* и *P. aeruginosa*). Выделенные изоляты лактобактерий проявляли наибольшую АА по отношению к *P. aeruginosa*, *E. coli* и в группе с цервикальной дисплазией, и в группе с нормоцитограммой, однако диаметры зон задержки роста были значимо ниже ($11,2 \pm 5,8$ и $18,2 \pm 2,4$ мм; $9,6 \pm 6,3$ и $19,0 \pm 4,2$ мм соответственно).
4. У женщин с цервикальной дисплазией практически все изоляты лактобактерий не продуцировали перекись водорода (92,3%) и обладали низкой способностью формировать биопленку (синтезировать основное вещество – 69,2%, накапливать биомассу – 46,2%).
5. Изучение состояния микробиоценоза влагалища и функций лактобактерий позволило установить потенциальную связь между изменениями микробиоты влагалища и цервикальной дисплазией. Были выявлены факторы, ассоциированные с дисплазией шейки матки, наличие которых позволит сформировать группы риска развития предопухолевой патологии среди женщин для их динамического наблюдения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Molina M.A., Steenberg R., Pumpe A., et al. HPV integration and cervical cancer: a failed evolutionary viral trait. *Trends Mol Med.* 2024;30(9):890–902. doi: 10.1016/j.molmed
2. Usyk M., Zolnik C.P., Castle P.E., et al. Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group. Cervicovaginal microbiome and natural history of HPV in a longitudinal study. *PLoS Pathog.* 2020;16(3):e1008376. doi: 10.1371/journal.ppat.1008376
3. Bowden S.J., Doulgeraki T., Bouras E., et al. Risk factors for human papillomavirus infection, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: an umbrella review and follow-up Mendelian randomisation studies. *BMC Med.* 2023;21(1):274. doi: 10.1186/s12916-023-02965-w
4. Li Y., Wu X. Vaginal microbiome distinction in women with HPV+, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical cancer, a retrospective study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025;14:1483544. doi: 10.3389/fcimb.2024.1483544
5. Kononova I.N., Voroshilina E.S., Zornikov D. L., et al. Vaginal microbiocenosis in patients with HPV-associated and HPV-negative cervical intraepithelial neoplasia. *Arkhiv Akusherstva i Ginekologii im. V.F. Snegiryova.* 2015;2(1):22–26. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobiotsenoz-vlagalishcha-u-patsientok-s-vpch-assotsirovannymi-i-vpch-negativnymi-tservikalnymi-intraepitelialnymi-neoplaziyami> (accessed 20.08.2025). (in Russian)
6. Anahtar M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., et al. Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity. *Cell Host Microbe.* 2018;23(2):159–168. doi: 10.1016/j.chom.2018.01.013
7. Dong M., Dong Y., Bai J., et al. Interactions between microbiota and cervical epithelial, immune, and mucus barrier. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1124591. doi: 10.3389/fcimb.2023.1124591
8. Sozonova E.A., Chapova N.E., Budanova E.V. Dynamic changes in the women's vaginal microbiota. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2021;20(4):106–114. doi: 10.20953/1726-1678-2021-4-106-114. (in Russian)
9. Frąszczak K., Barczyński B., Kondracka A. Does *Lactobacillus* Exert a Protective Effect on the Development of Cervical and Endometrial Cancer in Women? *Cancers (Basel).* 2022;14(19):4909. doi: 10.3390/cancers14194909
10. Mitra A., MacIntyre D.A., Ntirtsos G., et al. The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions. *Nat Commun.* 2020;11(1):1999. doi: 10.1038/s41467-020-15856-y
11. Rakhmatullaeva M.M., Navruzova N.O. Lactobacilli of the vagina: their types, properties and role in vaginal biotope. *Doktor Axborotnomasi.* 2019;2:154–158. Available at: https://inlibrary.uz/index.php/doctors_herald/article/view/2466 (accessed 20.08.2025). (in Russian)
12. Zakaria Goma E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol.* 2013;59:425–436. doi: 10.2323/jgam.59.425
13. Irkitova A.N., Kagan Ya.R., Sokolova G.G. Comparative Analysis of the Methods to Define Antagonistic Activity of Lactic Bacteria. *Izvestiya of the Altai State University.* 2012;3(1):41–44. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitelnyy-analiz-metodov-opredeleniya-antagonisticheskoy-aktivnosti-molochnokislyh-bakteriy> (accessed 20.08.2025). (in Russian)
14. Yarets, Yu.I. Method for assessing the ability of bacteria to form a biofilm: patent for invention BY 20326 IPC C12Q1/02. Patent № a 20130260. *Official Bulletin of the National Center for Intellectual Property, Minsk.* 2016;4(111):137–138. Available at: <https://ncip.by/upload/iblock/48b/48be b90d6d001e5ef24214b2bcb23112.pdf>. (in Russian)
15. Tikhomirov A.L., Kazenashev V.V., Sarsaniya S.I., et al. Prebiotic correction in bacterial vaginosis. *Meditinskiy sovet.* 2017;2(2):66–68. doi: 10.21518/2079-701X-2017-2-66-68. (in Russian)
16. Kovachev S.M. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. *Arch Microbiol.* 2020;202(2):323–327. doi: 10.1007/s00203-019-01747-4
17. Wei W., Xie L.Z., Xia Q., et al. The role of vaginal microecology in the cervical cancer. *J Obstet Gynaecol Res.* 2022 Sep;48(9):2237–2254. doi: 10.1111/jog.15359
18. Moscicki A.B., Shi B., Huang H., et al. Cervical-vaginal Microbiome and Associated Cytokine profiles in a prospective study of HPV 16 Acquisition, persistence, and Clearance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:569022. doi: 10.3389/fcimb.2020.569022



19. Wang Y., Wang X., Zhu M., et al. The interplay between Cervicovaginal Microbial Dysbiosis and Cervicovaginal Immunity. *Front Immunol.* 2022;13:857299. doi: 10.3389/fimmu.2022.857299
20. Wang K.D., Xu D.J., Wang B.Y., et al. Inhibitory Effect of Vaginal Lactobacillus Supernatants on Cervical Cancer Cells. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018;10(2):236–242. doi: 10.1007/s12602-017-9339-x
21. Valeriano V.D., Lahtinen E., Hwang I.-C., et al. Vaginal dysbiosis and the potential of vaginal microbiome-directed therapeutics. *Front. Microbiomes.* 2024;3:1363089. doi: 10.3389/frmbi.2024.1363089
22. O'Hanlon D.E., Moench T.R., Cone R.A., et al. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e80074. doi: 10.1371/journal.pone.0080074
23. Avitabile E., Menotti L., Croatti V., et al. Protective Mechanisms of Vaginal Lactobacilli against Sexually Transmitted Viral Infections. *Int J Mol Sci.* 2024;25(17):9168. doi: 10.3390/ijms25179168
24. Isayeva A.S., Letarov A.V., Ilyina E.N., et al. Species identification of vaginal lactobacilli isolated in reproductive-age women. *Obstetrics and Gynecology.* 2012;3:60–64. Available at: <https://aig-journal.ru/articles/Vidovaya-identifikaciya-vlagalishnyh-laktobacill-vydelennyh-u-jenshin-reproduktivnogo-vozrasta.html> (accessed 20.08.2025). (in Russian)
25. Zhong L., Zheng J., Wang Z., et al. Metabolomics and proteomics reveal the inhibitory effect of Lactobacillus crispatus on cervical cancer. *Talanta.* 2025;281:126839. doi: 10.1016/j.talanta.2024.126839
26. Nunn K.L., Wang Y.Y., Harit D., et al. Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with Lactobacillus crispatus-Dominant Microbiota. *mBio.* 2015;6(5):e01084–15. doi: 10.1128/mBio.01084-15
27. Cui M., Wu Y., Liu Z., et al. Advances in the interrelated nature of vaginal microecology, HPV infection, and cervical lesions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025;15:1608195. doi: 10.3389/fcimb.2025.1608195



Лемеш А.В.✉, Якубцевич Р.Э.

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь
Гродненская университетская клиника, Гродно, Беларусь

Лабораторные маркеры клостридиальной инфекции у пациентов с сепсисом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Лемеш А.В. – проведение исследования, написание текста, обзор литературы; Якубцевич Р.Э. – редактирование.

Финансирование: исследование проведено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта «Разработка персонализированного подхода в лечении антибиотик-ассоциированной диареи на основании генетических предикторов ее развития у пациентов с сепсисом», № гос. регистрации 20231275.

Подана: 10.03.2025

Принята: 18.08.2025

Контакты: anton_lemesh@mail.ru

Резюме

Введение. *Clostridium difficile* (*C. difficile*) является частым возбудителем нозокомиальной диареи, что представляет собой серьезную проблему современного здравоохранения. За последние три десятилетия резко увеличилась заболеваемость и тяжесть инфекции *C. difficile* (ИКД) во всем мире. *C. difficile* – грамположительная анаэробная спорообразующая и токсинпродуцирующая бацилла, принадлежащая к роду *Clostridium*. Факторами вирулентности *C. difficile* являются высокомолекулярные клостридиальные токсины: токсин А (TcdA) и токсин В (TcdB). К маркерам, оценивающим уровень проницаемости и повреждения кишечного эпителия, относится белок, связывающий жирные кислоты.

Цель. Провести сравнительный анализ уровня клостридиальных токсинов в сыворотке крови и кале (стуле) пациентов в критическом состоянии, у которых развилась антибиотик-ассоциированная диарея на фоне приема карбапенемовых антибиотиков, а также выполнить биохимическое исследование содержания в сыворотке крови белка, связывающего жирные кислоты, для оценки повреждения целостности интестинального барьера у пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей.

Материалы и методы. Проведен лабораторный скрининг 29 пациентов отделения интенсивной терапии. Количественное определение уровня токсинов, белка, связывающего жирные кислоты, в биологическом материале пациентов осуществлялось с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа по методу, основанному на ферментсвязанной иммуносорбентной сэндвич-технологии. Количественное определение содержания белка проводилось на иммуноферментном анализаторе при длине волны 450 нм.

Результаты. В ходе исследования были установлены медианные значения концентрации клостридиальных токсинов в крови: 223 нг/л для токсина А и 1169 нг/л для токсина В. Отмечено, что при высоком уровне токсинов в крови лишь у 52% пациентов был обнаружен токсин *C. difficile* в кале. Показано, что повышенная концентрация белка, связывающего жирные кислоты, составляющая 639 нг/л, может служить



маркером нарушения целостности кишечного эпителия у пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии с антибиотик-ассоциированной диареей, индуцированной карбапенемами.

Заключение. Высокий уровень распространенности инфекции *C. difficile*, синдрома повышенной эпителиальной проницаемости у септических пациентов в отделении интенсивной терапии требует изучения и использования дополнительных методов диагностики при критических заболеваниях, сопровождающихся гастроинтестинальной недостаточностью. При сохраняющейся диарее на фоне отрицательного или сомнительного результата анализа на *C. difficile* в кале (стуле) необходимо дополнительное обследование, сводящееся к определению уровня клостридиальных токсинов А и В крови, а также белка, связывающего жирные кислоты, – тестов оценки целостности кишечного барьера.

Ключевые слова: *Clostridium difficile*, токсин А *C. difficile*, токсин В *C. difficile*, клостридиальная инфекция, белок, связывающий жирные кислоты, сепсис

Lemesh A.✉, Yakubtsevich R.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus
Grodno University Clinic, Grodno, Belarus

Laboratory Markers of Clostridial Infection in Patients with Sepsis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Lemesh A. – research conducting, text writing, literature review; Yakubtsevich R. – editing.

Funding: the study was conducted with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research within the framework of the scientific project "Elaboration of a personalized approach to the treatment of antibiotic-associated diarrhea based on its genetic predictors in patients with sepsis", state registration number 20231275.

Submitted: 10.03.2025

Accepted: 18.08.2025

Contacts: anton_lemesh@mail.ru

Abstract

Introduction. *Clostridium difficile* (*C. difficile*) is a common cause of nosocomial diarrhea and a major public health issue. Over the past three decades, the incidence and severity of *C. difficile* infection have increased dramatically worldwide. *C. difficile* is a Gram-positive, anaerobic, spore-forming, and toxin-producing bacillus belonging to the genus *Clostridium*. The virulence factors of *C. difficile* are high-molecular clostridial toxins: toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB). One of the markers assessing the level of permeability and damage to the intestinal epithelium is fatty acid binding protein.

Purpose. To perform a comparative analysis of clostridial toxin levels in the blood serum and feces (stool) of critically ill patients presenting with antibiotic-associated diarrhea against the background of carbapenem antibiotics, as well as to conduct a biochemical assay of the blood serum content of fatty acid-binding protein to evaluate damage to the integrity of the intestinal barrier in patients with antibiotic-associated diarrhea.

Materials and methods. A total of 29 patients in the intensive care unit underwent laboratory screening. The quantification of toxins and fatty acid-binding protein was

performed using enzyme-linked immunosorbent assay kits based on enzyme-linked immunosorbent sandwich technology. The quantification of protein content was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay analyzer at a wavelength of 450 nm.

Results. The study established median values for clostridial toxin blood levels: 223 ng/L for toxin A and 1169 ng/L for toxin B. It was noticed that with high blood toxin levels, *C. difficile* toxin was only detected in the feces of 52% of patients. Furthermore, it was shown that elevated fatty acid-binding protein level as high as 639 ng/L could serve as a marker of intestinal epithelial impairment in intensive care unit patients with carbapenem-associated antibiotic-associated diarrhea.

Conclusion. The high prevalence of CDI and increased epithelial permeability syndrome in septic patients in intensive care units require investigating and using additional diagnostic methods in critical conditions accompanied by gastrointestinal failure. If diarrhea persists despite a negative or inconclusive *C. difficile* stool test result, additional tests are needed to determine clostridial toxin A and B blood levels, as well as fatty acid-binding protein levels, which are tests for assessing intestinal barrier integrity.

Keywords: *Clostridium difficile*, *C. difficile* toxin A, *C. difficile* toxin B, clostridial infection, fatty acid binding protein, sepsis

■ ВВЕДЕНИЕ

C. difficile является основной причиной инфекций, связанных с незамедлительным оказанием медицинской помощи, и антибиотик-ассоциированной диареей у госпитализированных пациентов во всем мире. Около 70% пациентов, поступивших в отделения интенсивной терапии, получают лечение антибиотиками. Антибиотик-ассоциированной диареей заболевают около 5–35% пациентов, получающих антибиотики. У пациентов, страдающих диареей, увеличивается продолжительность пребывания в отделении интенсивной терапии и возрастает смертность по сравнению с таковой у пациентов без диареей [1].

Около 90% кишечной микрофлоры теряется в течение 6 часов после поступления пациента в отделение интенсивной терапии. Микробиота кишечника у пациентов, пребывающих в критическом состоянии, определяется как патобиота [2]. Одним из самых вирулентных штаммов патобиоты, способных вызывать значительные изменения в организме тяжелообольного пациента, является *C. difficile*.

C. difficile – облигатно анаэробная грамположительная спорообразующая цитотоксинпродуцирующая бацилла. Определяется в составе кишечного микробиома в количестве не более 10^7 КОЕ/мл у 3–15% взрослых индивидуумов. Основными факторами вирулентности инфекции служат токсины A (TcdA), B (TcdB) и бинарный токсин. Воздействие токсинов вызывает повреждение кишечной стенки и воспаление в ней вследствие нарушения кишечного эпителиального барьера, индукции провоспалительных цитокинов, апоптоза и некроза эпителиоцитов [3].

Инфекция *C. difficile* (ИКД) диагностируется путем подтверждения наличия токсигенного штамма *C. difficile* или одного из его токсинов в стуле пациента с симптомами, соответствующими заболеванию. В отличие от большинства других бактериальных инфекций, выделение этого микроорганизма в культуре является дорогостоящим,



требует много времени и недостаточно для доказательства заболевания из-за наличия нетоксигенных *C. difficile* в стуле. Диагностика ИКД претерпела несколько серьезных изменений за четыре десятилетия с тех пор, как бактерия *C. difficile* была впервые описана как человеческий патоген. Обнаружение токсинов с использованием иммуноанализа вытеснило методы, основанные на применении культуральных способов исследования и/или способов обнаружения цитотоксинов. Наличие нетоксигенных штаммов *C. difficile* может привести к ложноположительному результату, превышающему 10%, если для диагностики ИКД используется только культуральная диагностика кала. Доказательство патогенности культивируемого микроорганизма требует дальнейшего анализа для определения наличия токсина А, токсина В или генов фактора вирулентности [4].

Уровень TcdA и TcdB в кале связан с тяжестью заболевания и уровнем смертности. Определение концентрации токсинов может быть объективным и точным способом оценки степени тяжести ИКД. Так, было показано, что уровень токсинов >2500 нг/л связан с повышенной смертностью у пациентов с развившейся ИКД [5]. Однако появляются работы, низко оценивающие эффективность использования иммуноферментного анализа стула для установления маркера выявления клостридиальных токсинов [6–8]. Кроме того, большинство лабораторных тестов не позволяет оценить типы и уровень токсинов по отдельности, а дает их суммарную оценку. По этим причинам Американским обществом инфекционных заболеваний и Американским обществом эпидемиологии здравоохранения рекомендуется проводить тест на токсин *C. difficile* в кале как часть многоэтапного алгоритма для выявления клинически значимой ИКД [9].

Одной из первых работ по оценке токсикоемии при ИКД стало исследование, выполненное группой авторов на контингенте пациентов с псевдомембранозным колитом, индуцированным *C. difficile* у детей. В этом исследовании впервые было установлено, что цитотоксин *C. difficile* может циркулировать вне кишечника при запущенном псевдомембранозном колите у детей. Данное явление наблюдалось только в случаях бактериальной инвазии слизистой или подслизистой оболочки. В случае болезни Гиршпрунга, когда микроорганизмы были ограничены поверхностными псевдомембранами до и после смерти, а также при перфорации кишечника циркуляция цитотоксина не наблюдалась [13]. Эти данные согласуются с результатами экспериментов на животных, показывающих, что TcdA и TcdB попадают в системный кровоток и вызывают генерализованное поражение лишь при преодолении кишечного барьера, в то время как при неосложненной диарее токсины в сыворотке крови не обнаруживаются [14]. Системная ИКД, скорее всего, обусловлена токсичностью TcdA и TcdB и индукцией образования провоспалительных цитокинов токсинами.

Низкая частота верификации токсинемии в клинической практике может быть обусловлена несколькими факторами: крайне низкой концентрацией циркулирующего токсина, наличием нейтрализующих антител, которые могут маскировать токсины и приводить к ложноотрицательным результатам. Подтверждением этому служит тот факт, что даже у пациентов с верифицированной ИКД токсины в крови выявляются редко. Только два случая с положительным результатом на токсемию были успешно выявлены среди 88 взрослых пациентов с ИКД [15, 16]. Таким образом, положительный результат теста на токсемию является маркером тяжелой формы ИКД и может ассоциироваться с неблагоприятным исходом, особенно у пациентов с сепсисом.

Вследствие влияния многочисленных механизмов, оказывающих повреждающее воздействие на кишечный барьер, в том числе и энтеро-/цитотоксинов *C. difficile*, у критических пациентов развивается повышенная эпителиальная проницаемость, сопровождающаяся транслокацией антигенов и токсинов кишечного микробиома в субэпителиальное пространство, а затем в системный кровоток, что приводит к генерализации процесса. Одним из маркеров, оценивающих состояние энтероцитов, может быть кишечная изоформа белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP). Белки, связывающие жирные кислоты (FABP), представляют собой класс низкомолекулярных (14–15 кДа) цитозольных белков, обнаруженных в высоких концентрациях в тканях, участвующих в поглощении и потреблении жирных кислот. В кишечнике присутствуют три изоформы FABP: I-FABP, печеночный (L)-FABP и белок, связывающий желчную кислоту в подвздошной кишке (I-BABP). I-FABP, L-FABP и I-BABP особенно высоко экспрессируются в клетках, присутствующих на вершинах ворсинок. Присутствие FABP на вершинах ворсинок – первоначальном месте разрушения при многочисленных кишечных заболеваниях – делает циркулирующие FABP потенциально полезными плазменными маркерами на ранних стадиях кишечного повреждения. I-FABP в основном ограничен зрелыми энтероцитами тонкого и толстого кишечника. I-FABP является полезным плазменным маркером ранней гибели клеток энтероцитов, и его уровни быстро повышаются после эпизодов острой кишечной ишемии и воспаления [10].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сравнительный анализ уровня клостридиальных токсинов в сыворотке крови и кале (стуле) пациентов в критическом состоянии, у которых развилась антибиотик-ассоциированная диарея на фоне приема карбапенемовых антибиотиков, а также выполнить биохимическое исследование содержания в сыворотке крови белка, связывающего жирные кислоты, для оценки повреждения целостности кишечного барьера у пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен лабораторный скрининг 29 пациентов отделения интенсивной терапии, у которых на фоне антибактериальной терапии развилась антибиотик-ассоциированная диарея. Взятие биологического материала для исследования (кала, крови) осуществлялось в первые сутки клинического проявления заболевания.

Метод определения TcdA, TcdB основан на твердофазном сэндвич-варианте иммуноферментного анализа. Количественное определение уровня токсина А в сыворотке крови проводилось с использованием наборов реагентов для иммуноферментного анализа Human Clostridium Difficile Toxin A (TOXA) ELISA. Интенсивность окрашивания была пропорциональна количеству содержащегося в образцах сыворотки крови токсина А. Количественное определение уровня токсина А в сыворотке крови с построением калибровочной кривой проводилось на иммуноферментном анализаторе Sunrise Tecan в течение 15 минут. Затем обрабатывались полученные данные, выводились средние показатели токсина А. Таким же методом проводили количественное определение уровня токсина В. Анализ осуществлялся с применением наборов реагентов для иммуноферментного анализа Human Clostridium Difficile Toxin B (TOXB) ELISA.



Все образцы фекалий пациентов с подозрением на ИКД хранились при температуре 4 °С до обработки или при температуре –80 °С, если образцы не могли быть обработаны в течение 24 часов. Фекальный уровень клостридиальных токсинов устанавливался с помощью набора реагентов VIDAS C. difficile Toxin A и B согласно инструкции производителя. Результат анализа рассчитывался прибором по следующей формуле: относительная величина флуоресценции образца / относительная величина флуоресценции стандарта. Интерпретация анализа осуществлялась согласно следующим результатам: <0,13 – отрицательный; ≥0,13 и <0,37 – спорный; ≥0,37 – положительный. Количественное определение уровня I-FABP в сыворотке крови проводилось с помощью наборов реагентов для иммуноферментного анализа Human IFABP/FABP2 (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) методом, основанным на ферментсвязанной иммуносорбентной сэндвич-технологии (ELISA). Количественное определение уровня I-FABP в сыворотке крови с построением калибровочной кривой осуществлялось на иммуноферментном анализаторе Sunrise Tecan при длине волны 450 нм.

Статистическую обработку данных производили с помощью программы Statistica 12.0 для Windows, используя методы описательной и аналитической статистики.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При определении уровня клостридиальных токсинов в кале 29 пациентов отделения интенсивной терапии были получены следующие данные: у 15 (52%) пациентов выявлялись токсины в кале (стуле), у 14 (48%) они не были выявлены.

При определении уровня TcdA, TcdB в сыворотке крови были получены следующие показатели тестов, представленные в таблице.

При сравнительном анализе достоверно значимых различий между уровнями токсина в крови и кале (стуле) выявлено не было, но была установлена пропорциональная взаимозависимость уровней TcdA и TcdB (r -Спирмена = 0,879; $p < 0,05$). При визуальном анализе отмечалась линейная связь между двумя величинами, т. е. рост уровня токсина А сопровождается пропорциональным повышением уровня токсина В (см. рисунок). При корреляционном анализе определялся в том числе коэффициент линейной корреляции Пирсона, который являлся статистически значимым, но в силу отсутствия нормальности распределения этот коэффициент не был приведен в работе, поэтому был представлен коэффициент ранговой корреляции Спирмена, не чувствительный к нормальности.

Ознакомление с данными литературы показало, что диапазон средней концентрации I-FABP в контрольных группах здоровых добровольцев составляет от 69±14

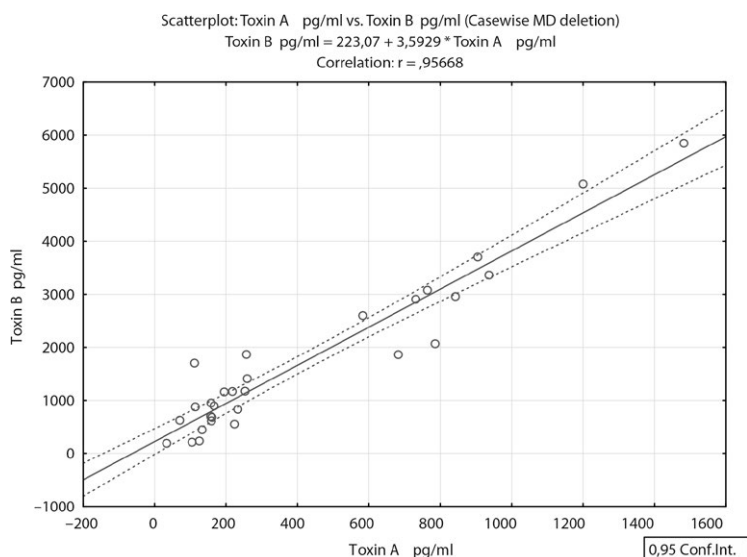
Уровни белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP), клостридиальных токсинов А и В в сыворотке крови у пациентов с сепсисом и ИКД
Fatty acid binding protein (I-FABP), clostridial toxins A and B blood levels in septic patients and CDI

Показатель	Минимальное – максимальное значения	$M \pm \sigma$	95% доверительный интервал средней	Медиана	25–75% процентиль
TcdA, нг/л	34,4–1482,1	415,4±385,8	306,1–521,8	223,3	156,9–731,1
TcdB, нг/л	191,7–5848,3	1715,6±1449	1149,9–1959,7	1169,1	680–2598,2
I-FABP, нг/л	40–12 858	2893±4009	3181,9–5422,6	639,7	247–4290

до $124,72 \pm 147,81$ нг/л [11]. При сравнении среднего значения у пациентов с антибиотик-ассоциированной диареей со средним «литературным» значением здоровых добровольцев был применен одновыборочный критерий Вилкоксона, который выявил достоверные различия между группами сравнения ($p < 0,001$).

В исследуемой группе отмечалось широкое колебание показателей I-FABP: от 40,1 до 12 858 нг/л. Согласно данным литературы, повышение уровня I-FABP коррелирует со степенью повреждения кишечника. Так, при различной степени травмы кишечника уровень I-FABP повышался от 231 до 1806 нг/л и достигал 84 000 нг/л у пациента с перфорацией кишки [11]. Также отмечена достоверная разница в уровне I-FABP у пациентов с неязвенным колитом, в зависимости от локализации и активности заболевания. Так, при левостороннем колите средние значения составляли $61,8 \pm 8,5$ нг/л, а при панколите достоверно достигали $260,5 \pm 606$ нг/л [12].

Медианное значение уровня I-FABP, равное 639 нг/л, ярко отражает степень повреждения целостности эпителия кишечника у критических пациентов отделения интенсивной терапии с антибиотик-ассоциированной диареей, что дает представление об ухудшении барьерной функции и гиперпроницаемости эпителия, а также демонстрирует важнейшую роль кишечника как мотора полиорганной дисфункции. Согласно результатам выполненного нами исследования, у пациентов с ИКД уровень I-FABP коррелировал с данными гистологического исследования биоптатов, которые выявили спектр изменений: от классической картины псевдомембранозного колита (слоистые псевдомембраны из фибрина и некротического детрита, расширенные крипты, фибриновые тромбы) до очагового активного колита с крипт-абсцессами, но без псевдомембран [17]. Мы не обнаружили достоверной связи между уровнем клостридиальных токсинов и I-FABP, что может быть связано с более выраженным повреждающим воздействием клостридиальных токсинов на стенку толстого кишечника.



Линейная зависимость между клостридиальными токсинами
Linear correlation between clostridial toxins



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что в ситуациях, характеризующихся отрицательными или спорными результатами тестирования кала на токсины А и В *C. difficile* и сохраняющейся диареей, представляется целесообразным определение в крови концентрации клостридиальных токсинов, а также уровня белка, связывающего жирные кислоты, для оценки повреждения целостности интестинального барьера у пациентов с сепсисом и антибиотик-ассоциированной диареей. Эти меры позволяют оценить степень повреждения кишечного барьера, а также тяжесть (активность) инфекционного процесса. Наличие клостридиальных токсинов в крови (уровень клостридиального токсина А ≥ 223 нг/л и/или уровень клостридиального токсина В ≥ 1169 нг/л) даже при первичном отрицательном скрининговом исследовании кала пациентов указывает на сохраняющуюся клостридиальную инфекцию, которая требует ее дополнительной диагностики и проведения соответствующей терапии. Оценка уровней I-FABP в плазме крови дает возможность контролировать наличие повреждения эпителиальных клеток кишечника, что качественно отличает данный метод диагностики от стандартного инвазивного метода в виде эндоскопической диагностики с биопсией, позволяющей оценить лишь функцию биопсийного участка кишечника. К тому же она не всегда осуществима у пациентов, пребывающих в критическом состоянии, в силу невозможности использования седации, коагулопатии, гемодинамической нестабильности и ряда других факторов. Кроме того, определение уровня I-FABP может помочь контролировать лечение, направленное на восстановление кишечного барьера, нарушения в котором сопровождаются более высокими показателями заболеваемости и смертности.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Viswanathan V.K., Mallozzi M.J., Vedantam G. Clostridium difficile infection: an overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. *Gut Microbes*. 2010;1(4):234–242.
2. Moron R., Galvez J., Colmenero M., et al. The importance of the microbiome in critically ill patients: role of nutrition. *Nutrients*. 2019;11(12). URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6950228/pdf/nutrients-11-03002.pdf> (date of access: 05.03.2025)
3. Ivashkin V.T., Yushchuk N.D., Maev I.V., et al. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association for the diagnosis and treatment of Clostridium difficile-associated disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Proctology*. 2016;26(5):56–65. (in Russian)
4. Riddle D.J., Dubberke E.R. Clostridium difficile infection in the intensive care unit. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2009;23(3):727–743.
5. Cohen N.A., Miller T., Na'amin W., et al. Clostridium difficile fecal toxin level is associated with disease severity and prognosis. *United European Gastroenterology Journal*. 2018;6(5):773–780.
6. Pérez-Topete S.E., Miranda-Aquino T., Hernández-Portales J.A. Positive predictive value of the immunoassay for Clostridium difficile toxin A and B detection at a private hospital. *Revista de Gastroenterología de México*. 2016;81(4): 190–194.
7. Erb S., Frei R., Strandén A.M., et al. Low sensitivity of fecal toxin A/B enzyme immunoassay for diagnosis of Clostridium difficile infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(11):998.e9–998.e15. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X15007338/pdf> (date of access: 05.02.2025)
8. Sandora T.J., Williams D.N., Daugherty K., et al. Stool toxin concentration does not distinguish clostridioides difficile infection from colonization in children less than 3 years of age. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2022;11(10): 454–458.
9. McDonald L.C., Gerding D.N., Johnson S., et al. Clinical practice guidelines for clostridium difficile infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*. 2018;66(7):e1–e48. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6018983/pdf/cix1085.pdf> (date of access: 05.03.2025)
10. Derikx J.P., Luyer M.D., Heineman E., et al. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(42):5272–5279.
11. Li I.A., Noskova K.K., Varvanina G.G., et al. Fatty acid binding protein (I-FABP) – a diagnostic marker of intestinal damage. *Laboratory Service*. 2015;4(1):26–29. (in Russian)
12. Wiercinska-Drapalo A., Jaroszewicz J., Siwak E., et al. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regulatory Peptides*. 2008;147(1/3):25–28.
13. Qualman S.J., Petric M., Karmali M.A., et al. Clostridium difficile invasion and toxin circulation in fatal pediatric pseudomembranous colitis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1990;94(4):410–416.
14. Steele J., Chen K., Sun X., et al. Systemic dissemination of Clostridium difficile toxins A and B is associated with severe, fatal disease in animal models. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(3):384–391.
15. Sprague R., Warny K., Pollock N., et al. Absence of Toxemia in Clostridioides difficile Infection: Results from Ultrasensitive Toxin Assay of Serum. *Digestive Diseases and Sciences*. 2021;66:3303–3306.
16. Feng H., Yu H., Chen K., et al. Identification of toxemia in patients with Clostridium difficile infection. *PLoS One*. 2015;10(4).
17. Lemesh A.V., Yakubtsevich R.E., Shulga A.V. Assessment of class I major histocompatibility complex-associated chain A (MICA) molecule levels in intensive care unit patients with clostridial infection. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2025;23(4):342–346.



Лямцева А.К.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

ПЦР-анализ в сочетании с секвенированием для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов при установлении этиологии перипротезной инфекции суставов

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 19.02.2025

Принята: 30.07.2025

Контакты: annaliamtsava@gmail.com

Резюме

Введение. Ген 16S рРНК – эволюционно сохраненный ген, встречающийся исключительно у бактерий и архей, выступающий в роли молекулярной мишени для идентификации микроорганизмов на уровне рода, вида. ПЦР гена 16S рРНК представляет собой привлекательную альтернативу для обнаружения и идентификации бактериальных патогенов в клинических образцах пациентов с перипротезной инфекцией суставов, у которых имеется высокое подозрение на инфекцию, но бактериальные культуры отрицательны.

Цель. Разработать и апробировать метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов в сочетании с секвенированием в синовиальной жидкости и синовиальной ткани для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции, обусловленной эндопротезированием коленного, тазобедренного суставов.

Материалы и методы. Проведена амплификация гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров с последующей детекцией результатов методом электрофореза. С помощью секвенирования по Сэнгеру проведена идентификация условно-патогенных микроорганизмов. Проведена оценка диагностической эффективности различных методов микробиологической диагностики перипротезной инфекции.

Результаты. Были установлены достоверные отличия по частоте выявления специфических ампликонов размером около 1500 пар нуклеотидов между основной и контрольной группами при электрофоретической детекции гена 16S рРНК в синовиальной жидкости и в синовиальной ткани. Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК показал высокую чувствительность (82,8% (95% ДИ: 71,8–90,1%)) и специфичность (95,0% (95% ДИ: 76,4–99,1%)) по сравнению с бактериологическим методом исследования (показатели диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста – 70,3% (95% ДИ: 58,2–80,1%) и 90,0% (95% ДИ: 69,9–97,2%) соответственно) биологического материала пациентов с перипротезной инфекцией суставов.



Заключение. Амплификация и секвенирование гена 16S рРНК имеет высокую диагностическую эффективность и позволяет идентифицировать условно-патогенные бактерии, участвующие в этиологии перипротезной инфекции суставов.

Ключевые слова: ПЦР, ген 16S рРНК, секвенирование, условно-патогенные микроорганизмы, перипротезная инфекция суставов, эндопротезирование суставов

Lyamtseva A.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

PCR Analysis Combined with Sequencing for Identifying the 16S rRNA Gene of Opportunistic Microorganisms in Establishing the Etiology of Periprosthetic Joint Infection

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 19.02.2025

Accepted: 30.07.2025

Contacts: annaliamtseva@gmail.com

Abstract

Introduction. The 16S rRNA gene is an evolutionarily conserved gene found exclusively in bacteria and archaea, and acting as a molecular target for identifying microorganisms at the genus and species level. 16S rRNA gene PCR represents an attractive alternative for detecting and identifying bacterial pathogens in clinical specimens from patients with periprosthetic joint infection presenting a high suspicion of infection but negative bacterial cultures.

Purpose. To elaborate and approve a universal PCR analysis method for identifying the 16S rRNA gene of opportunistic pathogens in combination with sequencing in synovial fluid and synovial tissue for etiologic identification of pathogens responsible for periprosthetic infection caused by knee and hip joint endoprosthesis replacement.

Materials and methods. Amplification of the 16S rRNA gene was performed using universal primers with subsequent detection of the results by electrophoresis. Sanger sequencing was used to identify opportunistic microorganisms. The diagnostic efficiency of various methods of microbiologic diagnostics of periprosthetic infection was evaluated.

Results. Significant differences were found in the frequency of detection of specific amplicons of about 1500 base pairs between the main and control groups in the electrophoretic detection of the 16S rRNA gene in synovial fluid and synovial tissue. The PCR method in combination with sequencing of the 16S rRNA gene showed high sensitivity (82.8% (95% CI: 71.8–90.1%)) and specificity (95.0% (95% CI: 76.4–99.1%)) compared with the bacteriologic research method (sensitivity and specificity of the test being 70.3% (95% CI: 58.2–80.1%) and 90.0% (95% CI: 69.9–97.2%), respectively) of biological material from patients with periprosthetic joint infection.

Conclusion. Both amplification and sequencing of the 16S rRNA gene have high diagnostic efficiency and allows identifying opportunistic bacteria involved in the etiology of periprosthetic joint infection.

Keywords: PCR, 16S rRNA gene, sequencing, opportunistic microorganisms, periprosthetic joint infection, endoprosthesis replacement

■ ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших достижений в клинической практике инфекционных заболеваний стало открытие нуклеиновых кислот. Возможность обнаруживать и идентифицировать молекулы нуклеиновых кислот микроорганизмов, главным образом путем амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), создала мощное средство для быстрого обнаружения культивируемых и некультивируемых бактерий. ПЦР с использованием универсальных праймеров с последующим секвенированием продуктов амплификации в настоящее время доступна для выполнения многим лабораториям медицинских учреждений. Концепция универсальной системы обнаружения и идентификации бактерий была предложена на основе гена 16S рибосомной РНК (рРНК), эволюционно сохраненного гена, встречающегося исключительно у бактерий и архей [1]. С помощью праймеров, комплементарных этим участкам, теоретически можно установить присутствие любой бактерии.

Гены прокариотической рРНК, в частности, включают 5S, 16S, 23S и межгенные области. Наиболее эффективные методы идентификации бактерий основаны на сравнении последовательностей важнейшего гена – 16S рРНК. Этот ген кодирует последовательность РНК в составе малой субъединицы (30S) прокариотических рибосом, имеет длину около 1500 пар нуклеотидов (п. н.) (~1,5 килобазы – это среднее значение, некоторые организмы могут иметь более короткие или длинные последовательности 16S). На рибосомах осуществляется трансляция мРНК с образованием пептидных цепей. Поскольку поддержание процесса трансляции и его надежность имеют ключевое значение, они обеспечиваются высококонсервативными последовательностями гена рРНК. Эти последовательности настолько постоянны, что их можно использовать для сравнения генов филогенетически отдаленных микроорганизмов. Другие, не столь важные для процесса трансляции участки этого гена испытывают гораздо меньшее давление отбора, поэтому для каждого вида они уникальны и позволяют отличать друг от друга близкие виды [2].

Несколько последовательностей 16S могут существовать в одной бактерии, и некоторые копии могут различаться [3]. Исследования геномного секвенирования также показывают, что многие виды бактерий имеют внутригенную гетерогенность, т. е. несут в себе несколько копий гена 16S рРНК и полиморфизмы между этими копиями, что позволяет проводить межвидовое подтипирование посредством частичного или полного секвенирования. 16S рРНК был широко изучен и применен для установления описания вида, таксономии вида и филогенетических отношений [2]. Таким образом, ген 16S рРНК является молекулярной мишенью выбора для идентификации патогенов на уровне рода или вида в клинической и научно-исследовательской лаборатории из-за его повсеместной природы среди бактерий и архей, а также обилия данных о последовательности гена.



В настоящее время в общедоступных базах данных GenBank и Ribosomal Database Project представлено более 125 000 последовательностей гена 16S рРНК бактерий. В настоящее время, чтобы идентифицировать новую бактерию, достаточно сравнить последовательность ее 16S рРНК с имеющимися в этих базах последовательностями, воспользовавшись для этого поисковой системой BLAST. Консервативные и вариабельные области гена 16S можно использовать в качестве объектов исследования с помощью ПЦР. Для изучения ранее неизвестных бактерий участок гена 16S любых бактерий можно амплифицировать, используя праймеры, гомологичные его консервативным последовательностям. С помощью праймеров, гомологичных видоспецифичным вариабельным областям этого гена, можно выявлять соответствующие бактерии в клиническом материале [4].

Перипротезная инфекция (ППИ) суставов является одним из самых серьезных осложнений в ортопедической хирургии. Последствия ППИ включают рецидивирующие инфекции, повторные хирургические ревизии, длительные курсы противомикробной терапии и высокую нагрузку как на качество жизни пациента, так и на общие расходы на здравоохранение [5]. Известно, что наиболее распространенными возбудителями ППИ являются грамположительные бактерии, особенно *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативные *Staphylococcus spp.*, за которыми следуют грамотрицательные бактерии. Учитывая широкий спектр потенциальных микроорганизмов как этиологического фактора ППИ, окончательная идентификация микробного агента является обязательной для оптимизации хирургической стратегии и начала соответствующей долгосрочной антибиотикотерапии [6].

ПЦР гена 16S рРНК представляет собой привлекательную альтернативу для обнаружения и идентификации бактериальных патогенов в клинических образцах пациентов, у которых имеется высокое подозрение на инфекцию, но бактериальные культуры отрицательны.

Исследования по использованию метода ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру гена 16S рРНК немногочисленны. В проспективном исследовании Marín M. и соавт. [7] было показано, что ПЦР-анализ гена 16S рРНК существенно повысил специфичность диагностики ППИ и имел лучшую положительную прогностическую ценность (96,3% и 91,7% соответственно), чем бактериологический метод исследования. Данный метод требовал также меньшего количества образцов и предоставлял возможность получения результатов в течение 24 часов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать и апробировать метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК условно-патогенных микроорганизмов в сочетании с секвенированием в синовиальной жидкости и синовиальной ткани для этиологической идентификации возбудителей перипротезной инфекции, обусловленной эндопротезированием коленного, тазобедренного суставов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основную группу исследования были включены 32 пациента с наличием признаков ППИ, которым за период с 2022 по 2024 г. в УЗ «Минская областная клиническая больница» (УЗ «МОКБ») было проведено первичное эндопротезирование тазобедренного или коленного сустава. В контрольную группу были включены

10 пациентов после эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава без признаков ППИ.

Возраст пациентов основной группы на момент обследования составил 57 (47/71) лет. В обследуемой группе пациентов удельный вес мужчин составил 62,5% (95% ДИ: 43,7–78,9%) (n=20), женщин – 37,5% (95% ДИ: 21,1–56,3%) (n=12). Возраст пациентов контрольной группы составил 51 (47/62) год, удельный вес мужчин составил 60,0% (95% ДИ: 26,2–87,8%) (n=6), женщин – 40,0% (95% ДИ: 12,2–73,8%) (n=4).

Критериями включения пациентов в основную группу исследования после эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава являлись:

- локальный отек тканей, болезненность при пальпации, местное повышение температуры, гиперемия кожных покровов, нарушение функции тазобедренного или коленного сустава;
- жалобы на повышение температуры тела, острое появление боли или любая хроническая боль в области эндопротеза на любом сроке после имплантации в первые несколько лет после установки эндопротеза, особенно при полном отсутствии безболевого периода после операции, проблемы с заживлением послеоперационной раны, поверхностная или глубокая инфекция;
- наличие свищевого хода, связанного с костью или имплантатом;
- наличие классических клинических симптомов воспаления в совокупности с признаками синдрома системной воспалительной реакции;
- наличие септического артрита смежных суставов;
- сочетанное превышение пороговых уровней в сыворотке крови 10 мг/л для СРБ и 30 мм/ч для СОЭ у пациентов с клиническими признаками ППИ (лихорадка, необъяснимая боль в месте артропластики, расшатывание эндопротеза и т. д.);
- превышение содержания в синовиальной жидкости лейкоцитов более 3000 клеток/мкл и долей палочкоядерных нейтрофилов более 70,0%;
- рентгенологически подтвержденное расшатывание компонентов эндопротеза.

Образцы синовиальной жидкости (n=42) и синовиальной ткани (n=42) у пациентов групп исследования были получены из полости исследуемых суставов с использованием разработанного врачами – травматологами-ортопедами метода артроскопической синовиальной биопсии, трепан-биопсии коленного/тазобедренного сустава из минимально инвазивных доступов под контролем электронно-оптического преобразователя (ЭОП) навигации. Синовиальную жидкость помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, синовиальную ткань – в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды с муколитиком («АртБиоТех», Республика Беларусь).

На базе УЗ «МОКБ» было проведено бактериологическое исследование биологического материала (посев на жидкую и плотную питательные среды) пациентов основной и контрольной группы исследования. Дальнейшие исследования были проведены на базе группы ПЦР-диагностики Научно-исследовательской лаборатории Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Выделение ДНК из синовиальной жидкости проводили с использованием готового коммерческого набора реагентов «АртДНК Легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Для выделения ДНК из синовиальной ткани применяли предварительную



гомогенизацию в течение 3 минут (частота 10/с) с использованием гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) с последующей экстракцией набором реагентов «АртСпин» («АртБиоТех», Республика Беларусь), основанного на применении колонок с сорбирующей мембраной. Для определения степени чистоты полученной ДНК проводили спектрофотометрический анализ (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

Аmplификацию проводили с использованием универсальных прокариотических праймеров: fD1 (прямой, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rP2 (обратный, 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'), нацеленных на гипервариабельные области V1 и V3 в гене 16S рПНК. Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «ArtMix Форез ДНК-полимераза» («АртБиоТех», Республика Беларусь); 0,4 мкл прямого праймера, 0,4 мкл обратного праймера, 6,7 мкл воды и 5 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации включала следующие стадии: начальная денатурация при 95 °С – 2 мин.; далее 30 циклов (денатурация при 94 °С – 30 с., отжиг праймеров при 55 °С – 30 с., элонгация при 72 °С – 1 мин.), финальная элонгация при 72 °С в течение 2 мин. Для проведения ПЦР применяли амплификатор Rotor-Gene-3000 (Corbett research, Австралия).

Для контроля выделения ДНК и отсутствия ингибитора ПЦР ген β -глобина человека амплифицировали для каждого образца с праймерами β GloF (прямой, 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') и β GloR (обратный, 5'-GGAAAATAGACCAATAGGCAG-3'). Состав амплификационной смеси включал: 12,5 мкл «2X премикс для ПЦР-РВ» («Прайтех», Республика Беларусь); 1,1 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного); 1,0 мкл интеркалирующего красителя ZUBR Green-1; 7,5 мкл воды и 3 мкл выделенной ДНК. Программа амплификации включала следующие стадии: начальная денатурация при 94 °С – 5 мин.; далее 35 циклов (денатурация при 94 °С – 30 с., отжиг праймеров при 55 °С – 30 с., элонгация при 72 °С – 30 с.), финальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Для проведения ПЦР применяли амплификатор Rotor-Gene-3000 (Corbett research, Австралия).

Для анализа продуктов амплификации использовали электрофорез в 1% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (концентрация 0,3 мг/л) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе. Длину амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярного веса DNA Ladder 1 kb («Евроген», РФ). Предполагаемые продукты амплификации для гена 16S рПНК имели размер примерно 1500 п. н. Амплифицированные образцы хранили при –20 °С.

В ходе подготовки ампликонов к постановке секвенирующей ПЦР использовали набор для ферментативной очистки ExS-Pure (Nimagen, Нидерланды). Секвенирующую ПЦР проводили с применением набора BrilliantDye Terminator v3.1 Cucle Sequencing Kit (Nimagen, Нидерланды) согласно протоколу производителя. Очистку полученных ампликонов выполняли с использованием набора реагентов iX-Pure DyeTerminator Cleanup Kit (Nimagen, Нидерланды).

Первые 500 п. н. гена 16S рПНК были секвенированы по прямой и обратной последовательностям праймеров на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США). Просмотр и интерпретацию полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения Sequencing Scanner Software 2 v.2.0 (Applied Biosystems, США). Полученные данные о нуклеотидной последовательности

в формате FASTA были использованы для поиска с помощью программы BLAST в базе нуклеотидных последовательностей GenBank через сервер NCBI (URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Для тестирования данных на подчинение закону нормального распределения использовались показатели асимметрии и эксцесса, W-критерий Шапиро – Уилка, критерий Колмогорова – Смирнова, а также осуществлялось построение графиков распределения. Данные не подчинялись закону нормального распределения, что позволило применить для статистической обработки непараметрические методы. Парные сравнения независимых выборок по количественным характеристикам проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Для представления полученных данных использовали показатели медианы (Me) и процентилей (Q_{25}/Q_{75}). Анализ категориальных признаков проводили с помощью точного критерия Фишера в таблице сопряженности 2x2. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости (p) менее 0,05.

Для качественных переменных определяли абсолютную частоту (n), относительную частоту – долю (%) от общего числа случаев в исследуемой группе и 95% доверительный интервал (95% ДИ) методом Клоппера – Пирсона.

Для сопоставления эффективности различных методов диагностики рассчитывали:

- диагностическую чувствительность (ДЧ): $ДЧ = [ИП \text{ (истинно положительные результаты теста)} / (ИП + ЛО \text{ (ложноотрицательные результаты теста)})] \times 100\%$;
- диагностическую специфичность (ДС): $ДС = [ИО \text{ (истинно отрицательные результаты теста)} / (ИО + ЛП \text{ (ложноположительные результаты теста)})] \times 100\%$;
- прогностическую ценность положительного (ПЦ+) результата: $ПЦ+ = [ИП / (ИП + ЛП)] \times 100\%$;
- прогностическую ценность отрицательного (ПЦ-) результата: $ПЦ- = [ИО / (ИО + ЛО)] \times 100\%$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки количества и качества выделенной ДНК из синовиальной жидкости (n=42) набором реагентов «АртДНК Легкий» и из синовиальной ткани (n=42) набором реагентов «АртСпин» проводили сравнение значений показателя $A_{260/280}$ а также значений пороговых циклов (Ct) при амплификации house-keeping гена β -глобина человека (табл. 1).

Таким образом, по показателям достоверных отличий с использованием методов статистического анализа выявлено не было ($p > 0,05$). Значение показателя $A_{260/280}$ для ДНК, выделенной набором реагентов «АртДНК легкий» и «АртСпин», близкое к 1,8,

Таблица 1
Значения соотношения $A_{260/280}$ и пороговых циклов, полученные при выделении ДНК (Me (Q_{25}/Q_{75}))
Table 1
Values of the ratio between $A_{260/280}$ and threshold cycles obtained during DNA extraction (Me (Q_{25}/Q_{75}))

Показатель	«АртДНК Легкий»	«АртСпин»
A260/280	1,77 (1,69/1,82)	1,79 (1,70/1,84)
Значение Ct	20,68 (18,81/24,20)	22,53 (20,47/25,19)



что указывает на отсутствие примесей белка и других ингибиторов. Амплификация гена β -глобина человека наблюдалась во всех образцах биологического материала, что также говорит об отсутствии ингибиторов ПЦР. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что как ДНК, выделенную из синовиальной жидкости набором реагентов «АртДНК Легкий», так и ДНК, выделенную из синовиальной ткани набором реагентов «АртСпин», можно использовать для дальнейших исследований.

Методом ПЦР была проведена амплификация гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров. На рис. 1 представлен электрофоретический анализ полученных ампликонов из синовиальной ткани пациентов основной группы.

При электрофоретическом анализе были зафиксированы четкие полосы свечения на уровне, соответствующем массе специфического ампликона, в 26 (81,3%; 95% ДИ: 63,6–92,8%) образцах синовиальной жидкости и в 27 (84,4%; 95% ДИ: 67,2–94,7%) образцах синовиальной ткани у пациентов основной группы. У пациентов контрольной группы в образцах синовиальной жидкости был детектирован 1 (10,0%; 95% ДИ: 0,3–44,5%) специфический ампликон при электрофоретической детекции, в образцах синовиальной ткани не было выявлено специфических ампликонов. С применением статистического анализа (точный критерий Фишера) были установлены достоверные отличия по частоте выявления полос свечения между основной

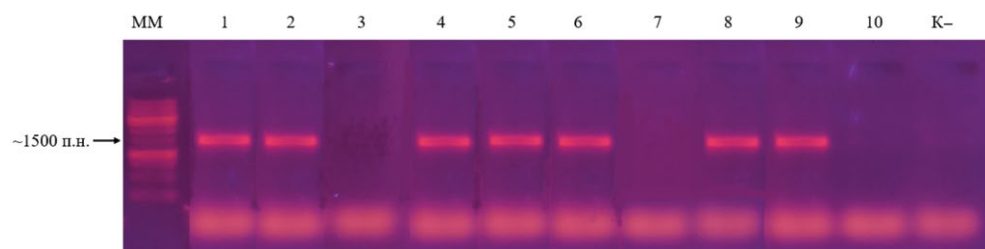


Рис. 1. Визуализация амплифицированного гена 16S рРНК. MM – маркер молекулярной массы ДНК; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 – положительные образцы; 3, 7, 10 – отрицательные образцы; K – отрицательный контроль (вода)

Fig. 1. Visualization of the amplified fragment of the 16S rRNA gene. MM – DNA molecular weight marker; 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 – positive samples; 3, 7, 10 – negative samples; K – negative control (water)

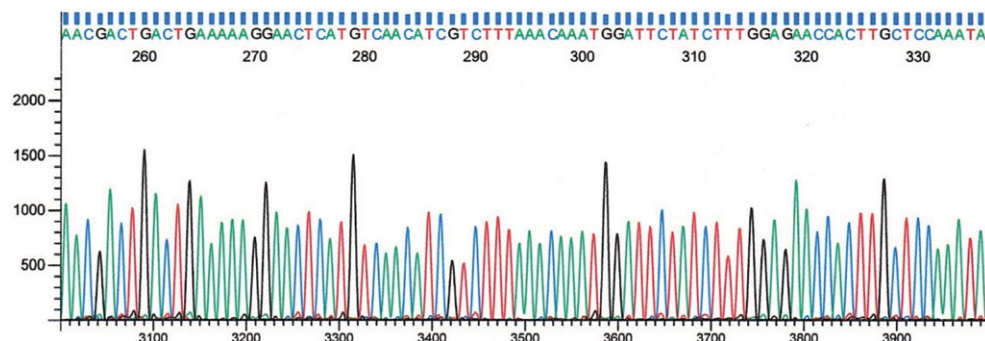


Рис. 2. Электрофореграмма полученной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК
Fig. 2. Electropherogram of the obtained nucleotide sequence of the 16S rRNA gene fragment

и контрольной группами при детекции гена 16S рРНК в синовиальной жидкости ($p<0,05$) и в синовиальной ткани ($p<0,05$).

На следующем этапе образцы, успешно прошедшие этап амплификации (появление четкой полосы свечения ПЦР-продукта), использовались для проведения секвенирующей ПЦР. Было проведено секвенирование по Сэнгеру начальной последовательности длиной 500 п. н. Полученные нуклеотидные последовательности гена

Таблица 2
Результаты выявления условно-патогенных микроорганизмов у основной группы пациентов
Table 2
Results of detection of opportunistic microorganisms in the main groups of patients

Название микроорганизма	Количество выявленных микроорганизмов			
	синовиальная жидкость (n=32)		синовиальная ткань (n=32)	
	методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, n (%; 95% ДИ)	бактериологическим методом, n (%; 95% ДИ)	методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, n (%; 95% ДИ)	бактериологическим методом, n (%; 95% ДИ)
1	2	3	4	5
Грамположительные бактерии	19 (59,38; 40,64–76,30)	16 (50,00; 31,89–68,11)	20 (62,50; 43,69–78,90)	18 (56,25; 37,66–73,64)
Staphylococcus aureus	7 (36,84; 16,29–61,64)	5 (31,25; 11,02–58,66)	7 (35,00; 15,39–59,22)	5 (27,78; 9,69–53,48)
Staphylococcus epidermidis	4 (21,05; 6,05–45,57)	2 (12,50; 1,55–38,35)	4 (20,00; 5,73–43,66)	3 (16,67; 3,58–41,42)
Staphylococcus lugdunensis	1 (5,26; 0,13–26,03)	0 (0,00; 0,00–20,59)	1 (5,00; 0,13–24,87)	0 (0,00; 0,00–18,53)
Streptococcus spp.	1 (5,26; 0,13–26,03)	1 (6,25; 0,16–30,23)	2 (10,00; 1,23–31,70)	1 (5,56; 0,14–27,29)
Propionibacterium acnes	2 (10,53; 1,30–33,14)	1 (6,25; 0,16–30,23)	2 (10,00; 1,23–31,70)	2 (11,11; 1,38–34,71)
Enterococcus faecalis	3 (15,79; 3,38–39,58)	4 (25,00; 7,27–52,38)	3 (15,00; 3,21–37,59)	4 (22,22; 6,41–47,64)
Fingoldia magna	1 (5,26; 0,13–26,03)	3 (18,75; 4,05–45,65)	1 (5,00; 0,13–24,87)	3 (16,67; 3,58–41,42)
Грамотрицательные бактерии	7 (21,88; 9,28–39,97)	5 (15,62; 5,28–32,79)	7 (21,88; 9,28–39,97)	6 (18,75; 7,21–36,44)
Escherichia coli	3 (42,86; 9,90–81,59)	2 (40,00; 5,27–85,34)	3 (42,86; 9,90–81,59)	2 (33,33; 4,33–77,72)
Enterobacter cloacae	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (20,00; 0,51–71,64)	1 (14,29; 0,36–57,87)	2 (33,33; 4,33–77,72)
Klebsiella pneumoniae	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00)	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00–45,93)
Proteus mirabilis	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00)	1 (14,29; 0,36–57,87)	0 (0,00; 0,00–45,93)
Serratia marcescens	0 (0,00; 0,00–40,96)	1 (20,00; 0,51–71,64)	0 (0,00; 0,00–40,96)	1 (16,67; 0,42–64,12)
Pseudomonas aeruginosa	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (20,00; 0,51–71,64)	1 (14,29; 0,36–57,87)	1 (16,67; 0,42–64,12)
Не выявлено	6 (18,75; 7,21–36,44)	11 (34,38; 18,57–53,19)	5 (15,62; 5,28–32,79)	8 (25,00; 11,46–43,40)



16S рРНК (рис. 2) сравнивали с последовательностями из базы данных GenBank с использованием программы BLAST.

Результаты идентификации микроорганизмов с помощью метода секвенирования гена 16S рРНК, а также бактериологическим методом в синовиальной жидкости и синовиальной ткани пациентов основной группы представлены в табл. 2.

В синовиальной жидкости пациентов контрольной группы методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК было детектировано наличие *Staphylococcus aureus* (n=1, 10,00%; ДИ: 0,25–44,50%), методом бактериологического посева у 2 пациентов (20,00%; ДИ: 2,52–55,61%) – *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecalis*. В синовиальной ткани пациентов контрольной группы как методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК, так и методом бактериологического посева условно-патогенных микроорганизмов выявлено не было.

В результате анализа полученных данных установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК в синовиальной жидкости (p=0,0098) и в синовиальной ткани (p=0,0006) пациентов.

С использованием методов статистического анализа установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий бактериологическим методом в синовиальной ткани пациентов (p=0,0022).

У 3 пациентов (9,4%; 95% ДИ: 2,0–25,0%) основной группы методом ПЦР гена 16S рРНК с последующим секвенированием выявленные возбудители также присутствовали в составе полимикробной инфекции: *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* + *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* + *Streptococcus spp.*, что дает основание предполагать, что они формируют биологические сообщества в виде биопленок, а значит, обладают уникальной способностью минимизировать влияние защитных факторов организма человека.

Таблица 3
Диагностическая эффективность методов диагностики ППИ в различном биологическом материале исследуемых пациентов
Table 3
Diagnostic efficiency of methods for diagnosing PJI in various biological materials from patients under study

Название метода исследования	ДЧ, % (95% ДИ)	ДС, % (95% ДИ)	ПЦ+, % (95% ДИ)	ПЦ-, % (95% ДИ)
1	2	3	4	5
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	82,8 (71,8–90,1)	95,0 (76,4–99,1)	98,1 (90,2–99,7)	63,3 (45,5–78,1)
Бактериологический метод	70,3 (58,2–80,1)	90,0 (69,9–97,2)	95,7 (85,8–98,8)	48,6 (33,4–64,1)
Синовиальная жидкость				
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	81,3 (64,7–91,1)	90,0 (59,6–98,2)	96,3 (81,7–99,3)	60,0 (35,7–80,2)
Бактериологический метод	65,6 (48,3–79,6)	80,0 (49,0–94,3)	91,3 (73,2–97,6)	42,1 (23,1–63,7)
Синовиальная ткань				
Метод ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК	84,4 (68,2–93,1)	100,0 (72,2–100,0)	100,0 (87,5–100,0)	66,7 (41,7–84,8)
Бактериологический метод	75,0 (57,9–86,7)	100,0 (72,2–100,0)	100,0 (86,2–100,0)	55,6 (33,7–75,4)

В табл. 3 представлены данные, отображающие диагностическую эффективность различных методов микробиологической диагностики ППИ.

Таким образом, полученные результаты показывают, что ПЦР-анализ с использованием универсальных праймеров с последующим анализом методом секвенирования повышает чувствительность и специфичность микробиологической диагностики ППИ. Сравнительные исследования разного биологического материала от пациентов с ППИ коленного/тазобедренного сустава показали наиболее высокую диагностическую ценность синовиальной ткани для молекулярно-биологической диагностики по сравнению с синовиальной жидкостью, что позволяет рекомендовать именно этот вид биологического материала для установления этиологического микробного фактора при ППИ, обусловленной эндопротезированием крупных суставов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ППИ суставов связана с серьезными осложнениями, потерей трудоспособности и высокими затратами на лечение, что обуславливает необходимость постановки этиологически правильного диагноза. Использование методов молекулярной диагностики позволяет быстро идентифицировать ДНК возбудителя и своевременно назначать таргетную антимикробную терапию.

Были установлены достоверные отличия по частоте выявления специфических ампликонов размером около 1500 пар нуклеотидов между основной и контрольной группами при электрофоретической детекции гена 16S рРНК в синовиальной жидкости и в синовиальной ткани.

С использованием точного критерия Фишера установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий методом ПЦР в сочетании с секвенированием гена 16S рРНК в синовиальной жидкости ($p=0,0098$) и в синовиальной ткани ($p=0,0006$) пациентов. Также установлены статистически значимые различия между основной и контрольной группой исследования по выявлению грамположительных бактерий бактериологическим методом в синовиальной ткани пациентов ($p=0,0022$).

Разработанный и апробированный метод универсального ПЦР-анализа для идентификации гена 16S рРНК в сочетании с секвенированием по сравнению с бактериологическим методом исследования показал высокую чувствительность (82,8% (95% ДИ: 71,8–90,1%)) и специфичность (95,0% (95% ДИ: 76,4–99,1%)) теста. Данный метод может быть использован как референсный для этиологической идентификации возбудителей ППИ.

Сравнительные исследования разного биологического материала показали наиболее высокую диагностическую ценность исследования синовиальной ткани: диагностическая чувствительность – 84,4% (95% ДИ: 68,2–93,1%), диагностическая специфичность – 100,0% (95% ДИ: 72,2–100,0%) для разработанного метода молекулярной диагностики ППИ после эндопротезирования крупных суставов.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Raoult D., Fournier P.E., Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol.* 2004;2:151–159. doi: 10.1038/nrmicro820
2. Church D.L., Cerutti L., Gürtler A., et. al. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(4):e00053-19. doi: 10.1128/CMR.00053-19
3. Větrovský T., Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One.* 2013;8(2):e57923. doi: 10.1371/journal.pone.0057923
4. Peker N., Garcia-Croes S., Dijkhuizen B., et. al. A Comparison of Three Different Bioinformatics Analyses of the 16S-23S rRNA Encoding Region for Bacterial Identification. *Front Microbiol.* 2019;10:620. doi: 10.3389/fmicb.2019.00620
5. Helwig P., Morlock J., Oberst M., et. al. Periprosthetic joint infection—effect on quality of life. *Int Orthop.* 2014;38(5):1077–1081. doi: 10.1007/s00264-013-2265-y
6. Zimmerli W., Trampuz A., Ochsner P.E. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004;351(16):1645–1654. doi: 10.1056/NEJMra040181
7. Marín M., Garcia-Lechuz J.M., Alonso P., et. al. Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):583–589. doi: 10.1128/JCM.00170-11



Сергиенко Е.Н.¹✉, Зверко В.В.², Фомина Е.Г.², Романова О.Н.¹

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск, Беларусь

Ассоциация полиморфизмов генов иммунной системы с риском и тяжестью сепсиса у детей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Сергиенко Е.Н. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, анализ полученных результатов, написание текста; Зверко В.В. – концепция и дизайн исследования, анализ полученных результатов; Фомина Е.Г. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Романова О.Н. – концепция и дизайн исследования.

Подана: 12.08.2025

Принята: 14.11.2025

Контакты: serhiyenka@yandex.com

Резюме

Введение. С целью поиска диагностических и прогностических маркеров при сепсисе активно ведутся исследования в области иммунопатогенеза и изучения влияния генетической составляющей на течение патологического процесса. К настоящему времени не существует ни одного биомаркера, достаточно специфичного для самостоятельного, без включения дополнительных тестов диагностики использования. В данной статье рассматривается роль генетических вариаций некоторых факторов иммунной системы как потенциальных биомаркеров для оценки риска развития сепсиса и его прогрессирования.

Цель. Изучить влияние полиморфизма генов иммунной системы на риск развития и течение сепсиса у детей.

Материалы и методы. Исследовано 123 пациента, из них пациенты с сепсисом – 52, бактериальными инфекциями – 36, здоровые дети – 35. Были изучены полиморфные варианты 8 генов, кодирующих белки врожденного иммунитета, которые, согласно данным литературы, могут быть связаны с сепсисом.

Результаты. Наличие генотипа G/G по полиморфизму G2258A гена TLR2 увеличивало шансы развития сепсиса в 4,2 раза (95% ДИ 1,43–12,068; $p=0,01$). Генотип C/G полиморфизма C-174G гена ИЛ-6 также был связан с повышенным риском возникновения сепсиса (OR=2,4; 95% ДИ 1,149–5,011; $p=0,03$). Генотип A/A полиморфизма A251T гена ИЛ-8 был ассоциирован с меньшей вероятностью развития септического шока (СШ) (OR=4,074; 95% ДИ 1,23–13,489; $p=0,03$), а генотип G/G полиморфизма G-1082A гена ИЛ-10 ассоциирован с большей вероятностью развития СШ (OR=0,347; 95% ДИ 0,129–0,935; $p=0,04$).

Заключение. В ходе исследования установлено, что генотип G/G по полиморфизму G2258A гена TLR2 и генотип G/G по полиморфизму C-174G гена ИЛ-6 являются факторами, коррелирующими с развитием сепсиса.

Ключевые слова: полиморфизм, гены, сепсис, дети, цитокины, иммунная система



Serhiyenka E.¹✉, Zverko V.², Fomina E.², Romanova O.¹

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of the Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Belarus

Association of Immune System Genes Polymorphisms with Sepsis Risk and Severity in Children

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Serhiyenka E. – study concept and design, material collection, obtained results analysis, text writing; Zverko V. – study concept and design, obtained results analysis; Fomina E. – study concept and design, editing; Romanova O. – study concept and design.

Submitted: 12.08.2025

Accepted: 14.11.2025

Contacts: serhiyenka@yandex.com

Abstract

Introduction. With the aim of finding diagnostic and prognostic markers for sepsis, active investigations are conducted in the field of immunopathogenesis and learning about the genetic factor's impact on the pathological process course. Currently, there is no biomarker that is specific enough to be used independently, without additional diagnostic tests. The article discusses the role of genetic variations in certain immune system factors as potential biomarkers for evaluating the risk for sepsis and its progression.

Purpose. To investigate the impact of immune system gene polymorphisms on the risk for sepsis and its progression in children.

Materials and methods. A total of 123 patients were examined, including 52 children with sepsis, 36 children with bacterial infections, and 35 healthy children. Polymorphic variants of 8 genes encoding innate immune proteins, which, according to the literature, could be associated with sepsis, were investigated.

Results. The presence of the G/G genotype for the G2258A polymorphism of the TLR2 gene increased the odds for sepsis by 4.2 times (95% CI 1.43–12.068; $p=0.01$). The C/G genotype of the C-174G polymorphism of the IL-6 gene was also associated with an increased risk of sepsis (OR=2.4; 95% CI 1.149–5.011; $p=0.03$). The A/A genotype of the A251T polymorphism of the IL-8 gene was associated with a lower probability of SS (OR=4.074; 95% CI 1.23–13.489; $p=0.03$), and the G/G genotype of the G-1082A polymorphism of the IL-10 gene was associated with a higher probability of septic shock (OR=0.347; 95% CI 0.129–0.935; $p=0.04$).

Conclusion. The study established that the G/G genotype for the G2258A polymorphism of the TLR2 gene and the G/G genotype for the C-174G polymorphism of the IL-6 gene are factors that correlate with sepsis onset.

Keywords: polymorphism, genes, sepsis, children, cytokines, immune system

■ ВВЕДЕНИЕ

Полиморфизм генов иммунной системы играет важную роль в патогенезе сепсиса, поскольку индивидуальные генетические вариации могут влиять на ответ

организма на инфекцию и предрасположенность к развитию сепсиса [1–3]. Полиморфизм может быть связан с различными генами иммунной системы, ответственными за определенные звенья патогенеза при сепсисе. Полиморфизмы в генах интерлейкинов могут влиять на продукцию этих же цитокинов, приводя к изменениям в уровне провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что нарушает баланс иммунного ответа и приводит к чрезмерной воспалительной реакции или недостаточной защите от инфекции [2–4]. Кроме того, полиморфизм генов может активировать клетки иммунной системы (Т-клетки, макрофаги и др.), что также может изменить клиническое течение сепсиса. Генетические вариации могут определять не только предрасположенность к сепсису, но и его тяжесть, а также выживаемость пациентов. Понимание генетических предрасположенностей может помочь в ранней диагностике и выборе наиболее эффективной терапии для конкретного пациента [5].

Один из наиболее изученных полиморфизмов – это -308 G/A полиморфизм в промоторе гена TNF, который, согласно данным литературы, демонстрирует влияние на риск развития сепсиса [6–9]. Исследования показали, что носители аллеля А имеют более высокий уровень продукции TNF-α и могут быть предрасположены к более тяжелым формам сепсиса из-за усиленного воспалительного ответа [7, 9].

Полиморфизм -174 G/C в промоторе гена IL-6 связан с изменением уровня продукции IL-6. Некоторые исследования показывают, что носители аллеля С могут иметь более высокий риск развития сепсиса и более тяжелые исходы [10–12]. IL-10 является противовоспалительным цитокином, и его полиморфизмы могут определять способность организма контролировать воспаление при инфекциях. Показано, что полиморфизмы -1082 A/G, -819 C/T и -592 A/C в гене IL-10 связаны с изменением уровня продукции этого противовоспалительного цитокина. Носители аллелей А ассоциированы с низкой продукцией IL-10 и более подвержены тяжелым формам сепсиса, так как IL-10 играет важную роль в подавлении избыточного воспалительного ответа. В одном из исследований была обнаружена прямая корреляция между полиморфизмом -592 A/C и повышенным риском сепсиса у пациентов с тяжелыми инфекциями. Полиморфизм -511 C/T в промоторе гена IL-1β связан с изменением уровня продукции IL-1β. Согласно некоторым литературным данным, носители аллеля Т могут иметь более высокий уровень этого провоспалительного цитокина, что сопровождается усилением воспалительного ответа и ассоциировано с увеличением риска сепсиса. Однако, согласно другим исследованиям, полиморфизм IL-1β +3954 C>T обеспечивает снижение риска развития сепсиса [13]. По результатам метаанализа, представленного коллективом авторов, полиморфизм IL-8-251 A/T ассоциирован с риском развития сепсиса, а также смертностью от него [14, 15]. Исследования полиморфизма -1188 A/C в гене IL-12 демонстрируют влияние его на уровень продукции IL-12, который активирует Т-клетки и NK-клетки, а изучение полиморфизма -137 G/C в гене IL-18 указывает на связь с изменением уровня продукции IL-18, увеличение уровня которого может способствовать усилению воспалительного ответа и увеличению риска развития сепсиса [5].

Кроме изучения полиморфизма генов, обуславливающих экспрессию цитокинов при сепсисе, большое количество публикаций посвящено генам и их полиморфизмам, связанным с рецепторами [16]. Так, например, полиморфизмы в генах, кодирующих рецепторы распознавания патогенов (PRRs), таких как TLR (рецепторы



Toll-подобного типа), могут влиять на способность иммунной системы распознавать патогены и реагировать на них. Полиморфизм Asp299Gly в гене TLR4 связывают с измененной чувствительностью к инфекциям [17, 18]. Носители этого полиморфизма могут иметь ослабленный ответ на эндотоксин, что может приводить к увеличению риска сепсиса при бактериальных инфекциях [19, 20].

Полиморфизмы в генах, регулирующих апоптоз, способны влиять на выживание иммунных клеток во время инфекции и, следовательно, – на тяжесть сепсиса. Например, полиморфизм -938 C/A в промоторе гена BCL2 может влиять на уровень экспрессии этого гена, который регулирует апоптоз [5, 21].

Полиморфизмы в гене C3 системы комплемента, такие как rs2230199, связаны с повышенным риском сепсиса и его тяжестью, так как система комплемента играет ключевую роль в иммунном ответе на инфекции [5].

Нами приведены результаты только малой части исследований, которые показывают, как различные полиморфизмы способны влиять на иммунный ответ и предрасполагать к развитию сепсиса. Понимание генетических механизмов может помочь в разработке новых методов диагностики и совершенствовании подходов к лечению септических процессов, а также в индивидуализации подходов к терапии для пациентов с высоким риском развития сепсиса [22–24].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние полиморфизма генов иммунной системы на риск развития и течение сепсиса у детей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовано 123 пациента, из них пациенты с сепсисом – 52 (основная группа), бактериальными инфекциями – 36 (группа сравнения), здоровые дети – 35 (группа контроля). По возрасту и полу группы пациентов сопоставимы.

ДНК выделяли из цельной крови с использованием набора реагентов для выделения ДНК/РНК («НК экстра», Республика Беларусь) в соответствии с рекомендациями производителя. Постановку ПЦР осуществляли на приборе Quant Studio 5 (Applied Biosystems, США) с использованием олигонуклеотидов, синтезированных ООО «Арт-БиоТех» (Республика Беларусь).

Полиморфизм генов устанавливали методом ПЦР с помощью наборов реагентов для определения олигонуклеотидного полиморфизма «TNF-αG308A», «LTAG+252A», «IL-4C-589T», «IL-8A251T», «IL-6 C-174G», «IL-10G-1082A», «TLR2Arg753Gln (G2258A)», «TLR4Asp299Gly(A896G)» (НПФ «Литех», РФ) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистический анализ

Полученные результаты обработаны с применением пакета программ Statistica for Windows 10 и программного обеспечения Statistica 13. Для проверки статистическими методами предположения о влиянии события на развитие исхода была составлена четырехпольная таблица сопряженности и рассчитаны следующие показатели: частота события в группах, «отношение шансов» (OR), 95% доверительные интервалы и р-значение.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали статистически значимую связь между определенными генетическими вариантами и риском развития сепсиса. В частности, наличие генотипа G/G по полиморфизму G2258A гена TLR2 увеличивало шансы возникновения сепсиса в 4,2 раза (95% ДИ 1,43–12,068; $p=0,01$). Кроме того, генотип C/G полиморфизма C-174G гена ИЛ-6 также был связан с повышенным риском сепсиса ($OR=2,4$; 95% ДИ 1,149–5,011; $p=0,03$) (табл. 1). Анализ частоты генотипов выявил, что генотип G/G полиморфизма G2258A гена TLR2 был значительно чаще обнаружен у детей с сепсисом (92,3%) по сравнению с таковым в контрольной группе (74,3%). Аналогичная тенденция наблюдалась для генотипа C/G полиморфизма C-174G гена ИЛ-6, который присутствовал у 61,5% детей с сепсисом и у 40% детей контрольной группы.

При исследовании частот генотипов полиморфизмов других генов, связанных с врожденным иммунитетом, статистически значимых различий между группой детей с сепсисом и контрольной группой обнаружено не было. Однако были отмечены следующие наблюдения: для полиморфизма G308A гена ФНО- α генотип A/A встречался в группе сепсиса в два раза чаще, чем в контрольной группе (5,8% против 2,9%). Аналогично для полиморфизма C-589T гена ИЛ-4 генотип C/T был в 1,5 раза более распространен (30,8% против 20%), а для полиморфизма G-1082A гена ИЛ-10 генотип G/G встречался в 1,7 раза чаще (34,6% против 20%).

Таблица 1
Распределение частот генотипов по полиморфным аллелям исследуемых генов в группе пациентов с сепсисом и контрольной группе, n/%
Table 1
Distribution of genotype frequencies by polymorphic alleles of the studied genes in the group of patients with sepsis and the control group, n/%

Ген	Группа пациентов с сепсисом	Группа контроля	OR; 95% ДИ	p
LTA (G+252A)				
G/G	4/7,7	5/14,2	0,5 (0,156–1,608)	0,16
G/A	20/38,5	15/42,9	0,833 (0,401–1,732)	0,34
A/A	28/53,8	15/42,9	1,555 (0,754–3,21)	0,16
ФНО- α (G308A)				
G/G	43/82,7	28/80	1,194 (0,476–2,998)	0,38
G/A	6/11,5	6/17,1	0,63 (0,226–1,76)	0,23
A/A	3/5,8	1/2,9	2,081 (0,301–14,406)	0,27
TLR2 Arg753Gln (G2258A)				
G/G	48/92,3	26/74,3	4,154 (1,43–12,068)	0,01
G/A	4/7,7	7/20	0,333 (0,111–1,004)	0,051
A/A	–	2/5,7	–	–
TLR4 Asp299Gly (A896G)				
A/A	45/86,5	27/77,1	1,905 (0,743–4,88)	0,13
A/G	7/13,5	8/22,9	0,525 (0,205–1,345)	0,13
G/G	–	–	–	–



Окончание таблицы 1

Ген	Группа пациентов с сепсисом	Группа контроля	OR; 95% ДИ	p
IL-4 (C-589T)				
C/C	34/65,4	27/77,1	0,559 (0,247–1,268)	0,12
C/T	16/30,8	7/20	1,777 (0,758–4,171)	0,13
T/T	2/3,8	1/2,9	1,36 (0,176–10,537)	0,4
IL-6 (C-174G)				
C/C	7/13,5	8/22,9	0,525 (0,205–1,345)	0,13
C/G	32/61,5	14/40	2,4 (1,149–5,011)	0,03
G/G	13/25	13/37,1	0,564 (0,259–1,231)	0,11
IL-8 (A251T)				
A/A	14/26,9	7/20	1,473 (0,621–3,499)	0,23
T/T	10/19,3	8/22,9	0,804 (0,334–1,936)	0,34
A/T	28/53,8	20/57,1	0,875 (0,369–2,075)	0,38
IL-10 (G-1082A)				
G/G	18/34,6	7/20	2,118 (0,91–4,927)	0,07
G/A	33/63,5	23/65,7	0,906 (0,427–1,925)	0,42
A/A	1/1,9	5/14,3	0,118 (0,019–0,742)	0,03

На основании анализа частот генотипов генов врожденного иммунитета было проведено дальнейшее исследование ассоциаций между различными генами и сепсисом путем сравнения показателей в группе пациентов с сепсисом и контрольной

Таблица 2
Распределение частот ассоциаций генотипов по полиморфным аллелям генов в группах, n/%
Table 2
Distribution of frequencies of genotype associations by polymorphic alleles of genes in the groups, n/%

Ассоциация генов	Группа пациентов с сепсисом	Группа контроля	OR; 95% ДИ	p
IL-6 (C-174G) генотип C/G + TLR2 (G2258A) генотип G/G	30/57,7	11/31,4	2,975 (1,397–6,338)	0,009
IL-10 (G-1082A) генотип G/G + TLR2 (G2258A) генотип G/G	18/34,6	6/17,1	2,558 (1,062–6,168)	0,04
IL-6 (C-174G) генотип C/G + IL-10 (G-1082A) генотип G/G	10/19,2	1/2,9	8,095 (1,384–47,354)	0,03
IL-6 (C-174G) генотип C/G + TLR2 (G2258A) генотип G/G + TLR4 (A896G) генотип G/G	24/46,2	9/25,7	2,476 (1,131–5,421)	0,03
TLR2 (G2258A) генотип G/G + TLR4 (A896G) генотип G/G	41/78,8	21/60	2,485 (1,121–5,51)	0,03

Таблица 3
Распределение частот генотипов по полиморфным аллелям исследуемых генов в группах пациентов с сепсисом с учетом наличия септического шока
Table 3
Distribution of genotypes frequencies by polymorphic alleles of the studied genes in the groups of patients with sepsis, taking into account the presence of septic shock

Ген	Группа пациентов с сепсисом без СШ, n=29	Группа пациентов с сепсисом с СШ, n=23	OR; 95% ДИ	p
LTA (G+252A)				
G/G	3/10,4	1/4,4	2,538 (0,358–17,988)	0,22
G/A	13/44,8	7/30,4	1,857 (0,707–4,879)	0,15
A/A	13/44,8	15/65,2	0,433 (0,168–1,117)	0,07
ФНО-α (G308A)				
G/G	22/75,9	21/91,2	0,299 (0,073–1,227)	0,07
G/A	5/17,2	1/4,4	4,583 (0,709–29,623)	0,09
A/A	2/6,9	1/4,4	1,629 (0,206–12,904)	0,34
TLR2 Arg753Gln (G2258A)				
G/G	26/89,6	22/95,6	0,393 (0,056–2,792)	0,21
G/A	3/10,4	1/4,4	2,538 (0,358–17,988)	0,22
A/A	–	–	–	–
TLR4 Asp299Gly (A896G)				
A/A	24/82,8	21/91,2	0,457 (0,106–1,971)	0,19
A/G	5/17,2	2/8,8	2,187 (0,507–9,432)	0,19
G/G	–	–	–	–
IL-4 (C-589T)				
C/C	18/62,1	16/69,6	0,716 (0,27–1,899)	0,29
C/T	9/31	7/30,4	1,028 (0,38–2,784)	0,48
T/T	2/6,9	–	–	–
IL-6 (C-174G)				
C/C	3/10,4	4/17,4	0,548 (0,142–2,116)	0,23
C/G	20/68,9	12/52,2	2,037 (0,786–5,281)	0,1
G/G	6/20,7	7/30,4	0,596 (0,207–1,722)	0,21
IL-8 (A251T)				
A/A	11/38	3/13,1	4,074 (1,23–13,489)	0,03
T/T	5/17,2	5/21,7	0,75 (0,235–2,392)	0,34
A/T	13/44,8	15/65,2	0,433 (0,168–1,117)	0,07
IL-10 (G-1082A)				
G/G	7/24,1	11/47,8	0,347 (0,129–0,935)	0,04
G/A	21/72,4	12/52,2	2,406 (0,913–6,34)	0,07
A/A	1/3,5	–	–	0,07

группе. Наше исследование выявило, что развитие сепсиса связано с определенными комбинациями генотипов. В частности, были обнаружены значимые ассоциации между следующими парами генотипов: C/G гена IL-6 (C-174G) и G/G гена TLR2 (G2258A); G/G гена IL-10 (G-1082A) и G/G гена TLR2 (G2258A); C/G гена IL-6 (C-174G) и G/G гена IL-10 (G-1082A); C/G гена IL-6 (C-174G) и G/G гена TLR2 (G2258A) в сочетании



с G/G геном TLR4 (A896G); а также G/G гена TLR2 (G2258A) и G/G гена TLR4 (A896G). Эти ассоциации были статистически значимы ($p < 0,05$). Подробные результаты этих значимых ассоциаций по полиморфным аллелям представлены в табл. 2.

В последующем был проведен внутригрупповой анализ с учетом развития септического шока (СШ), который представлен в табл. 3. Установлено, что генотип A/A полиморфизма A251T гена ИЛ-8 был ассоциирован с меньшей вероятностью развития СШ (OR=4,074; 95% ДИ 1,23–13,489; $p=0,03$). Частота встречаемости генотипа A/A была в 2,9 раза ниже в группе пациентов с СШ (13,1%) по сравнению с таковой в группе без СШ (38%). Генотип G/G полиморфизма G-1082A гена ИЛ-10 был ассоциирован с большей вероятностью развития СШ (OR=0,347; 95% ДИ 0,129–0,935; $p=0,04$). Частота встречаемости генотипа G/G была в 2 раза выше в группе пациентов с СШ (47,8% против 24,1% соответственно).

Установлена также ассоциация между некоторыми генетическими полиморфизмами и наличием сепсиса с СШ у детей. Так, генотип A/A для полиморфизма G+252A гена LTA наблюдался в 1,5 раза чаще у детей с СШ по сравнению с группой без СШ (65,2% против 44,8%). Генотипы C/C и G/G по полиморфизму C-174G гена ИЛ-6 встречались у детей с СШ чаще, чем без СШ (в 1,7 и 1,5 раза соответственно). Также генотип A/T по полиморфизму A251T гена ИЛ-8 был в 1,5 раза более распространен в группе с СШ (65,2% против 44,8%), но эти данные не были статистически значимыми.

Проведенный сравнительный анализ с группой пациентов с бактериальными инфекциями и внутригрупповой анализ с учетом наличия бактериемии в группе пациентов с сепсисом не выявил значимых различий в распределении частот генотипов по полиморфизмам исследуемых генов.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ассоциация с повышенным риском сепсиса была установлена для генотипа G/G по полиморфизму G2258A гена TLR2 (OR=4,154; 95% ДИ 1,43–12,068; $p=0,01$) и генотипа C/G по полиморфизму C-174G гена ИЛ-6 (OR=2,4; 95% ДИ 1,149–5,011; $p=0,03$). Кроме того, комбинации некоторых генотипов в генах IL-6, IL-10, TLR2 и TLR4 также продемонстрировали связь с развитием сепсиса ($p < 0,05$). Кроме того, у детей с сепсисом чаще встречались определенные генетические варианты: генотип A/A по полиморфизму G308A в гене ФНО- α (в 2 раза чаще), генотип C/T по полиморфизму C-174G в гене ИЛ-4 (в 1,5 раза чаще) и генотип G/G по полиморфизму G-1082A в гене ИЛ-10 (в 1,7 раза чаще) по сравнению со здоровыми детьми.

В группе пациентов с сепсисом и СШ были выявлены следующие значимые отличия по сравнению с пациентами без СШ: генотип G/G по полиморфизму G-1082A гена ИЛ-10 встречался в 2 раза чаще (OR=0,347; 95% ДИ 0,129–0,935; $p=0,04$), а генотип A/A по полиморфизму A251T гена ИЛ-8 встречался в 2,9 раза реже (OR=4,074; 95% ДИ 1,23–13,489; $p=0,03$). Частота генотипа A/A по полиморфизму G+252A гена LTA в группе детей с сепсисом и СШ была в 1,5 раза выше по сравнению с группой без СШ, генотипа C/C по полиморфизму C-174G гена ИЛ-6 – в 1,7 раза, а генотипа G/G – в 1,5 раза, генотипа A/T по полиморфизму A251T гена ИЛ-8 – в 1,5 раза ($p > 0,05$).

Судя по полученным данным, следует полагать, что генетические факторы оказывают значительное влияние на предрасположенность к сепсису и его течение. Генетические вариации, в частности полиморфизмы генов цитокинов, могут существенно изменять ответ организма на инфекцию и сепсис. Дальнейшие исследования

в данном направлении должны быть сосредоточены на раскрытии сложной генетической природы сепсиса, что будет способствовать совершенствованию диагностики и тактики лечения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Osikov M., Telesheva L., Konashov A. et al. The role of genetic polymorphisms of hemostasis factors in the pathogenesis and prognosis of sepsis (review). 2024;2(136):230–246. (in Russ.) doi: 10.34680/2076-8052.2024.2(136).230-246
- Meneses do Rêgo A.C., Araújo-Filho I. Association of Cytokine Gene Polymorphisms with Inflammatory Responses and Sepsis Outcomes in Surgical and Trauma Patients. *Arch Surg Clin*.
- Liang J., Su Y., Wang N. et al. A meta-analysis of the association between inflammatory cytokine polymorphism and neonatal sepsis. *PLoS One*. 2024;19(6): e0301859. doi: 10.1371/journal.pone.0301859
- Gupta D.L., Sinha T., Bhoi S. et al. Cytokine Gene Polymorphism and Sepsis. *Infectious Process and Sepsis*. IntechOpen: London, UK, 2020. doi: 10.5772/intechopen.90572
- Lu H., Wen D., Wang X. et al. Host genetic variants in sepsis risk: a field synopsis and meta-analysis. *Crit Care*. 2019;23:26. doi: 10.1186/s13054-019-2313-0
- Fatani S.H., Alkhatib K.H., Badr H., Alrefai A.A. Association of TNF- α -308 (G>A) (rs1800629) Gene Polymorphism with Adverse Outcomes of Sepsis in Critically Ill Patients. *DNA Cell Biol*. 2020;39(9):1723–1729. doi: 10.1089/dna.2020.5468
- Hugo Montes A., Valle-Garay E., Martin G. et al. The TNF- α (-238 G/A) polymorphism could protect against development of severe sepsis. *Innate Immun*. 2021;27(5):409–420. doi: 10.1177/17534259211036186
- Feng B., Mao Z.R., Pang K. et al. Association of tumor necrosis factor α -308G/A and interleukin-6 -174G/C gene polymorphism with pneumonia-induced sepsis. *J Crit Care*. 2015;30(5):920–3. doi: 10.1016/j.jcrc.2015.04.123
- Georgescu A.M., Banescu C., Azamfirei R. et al. Evaluation of TNF- α genetic polymorphisms as predictors for sepsis susceptibility and progression. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):221. doi: 10.1186/s12879-020-4910-6
- Gao Jw, Zhang Aq, Pan W. et al. Association between IL-6-174G/C Polymorphism and the Risk of Sepsis and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0118843. doi: 10.1371/journal.pone.0118843
- Chen Y., Hu Y., Song Z. The association between interleukin-6 gene -174G/C single nucleotide polymorphism and sepsis: an updated meta-analysis with trial sequential analysis. *BMC Medical Genetics*. 2019;20(1):35. doi: 10.1186/s12881-019-0766-2
- Baghel K., Srivastava R.N., Chandra A. et al. TNF- α , IL-6, and IL-8 cytokines and their association with TNF- α -308 G/A polymorphism and postoperative sepsis. *J Gastrointestinal Surg*. 2014;18(8):1486–94. doi: 10.1007/s11605-014-2574-5
- Fu P., Xie S., Zhang X. Investigation of the IL-1 β +3954 C>T polymorphism and the risk of sepsis: A case-control study. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(31): e21022. doi: 10.1097/MD.00000000000021022
- Fu P., Xie S., Zhang X. IL-8 gene locus is associated with risk, severity, and 28-day mortality of sepsis in a Chinese population. *Clin Exp Med*. 2019;19(4):571–576. doi: 10.1007/s10238-019-00584-5
- Zhao S., Gong J., Yin S., Li X., Zhao S., Mou T., Luo S. The association between interleukin-8 gene-251 A/T polymorphism and sepsis: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(15): e25483. doi: 10.1097/MD.00000000000025483
- Georgescu A.M., Grigorescu B.L., Chirteş I.R. et al. The Relevance of Coding Gene Polymorphisms of Cytokines and Cellular Receptors in Sepsis. *J Crit Care Med (Targu Mures)*. 2017;3(1):5–11. doi: 10.1515/jccm-2017-0001
- Zhu L., Li X., Miao C. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene*. 2012;501:213–8.
- Wang H., Wei Y., Zeng Y. et al. The association of polymorphisms of TLR4 and CD14 genes with susceptibility to sepsis in a Chinese population. *BMC Med Genet*. 2014;15:123.
- Mansur A., von Gruben L., Popov A.F., et al. The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. *J Transl Med*. 2014;12:177.
- Gao J.W., Zhang A.Q., Wang X., et al. Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis. *Crit Care*. 2015;19:416.
- Kovzel V., Davydova L., Lapina T. et al. Genetic, Metabolic, and Proteomic Polymorphisms and Clinical Phenotypes of Sepsis. *General Reanimatology*. 2024;20(6):36–54. Available at: <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2024-6-2470> (in Russian)
- Vincent J.L. Individual gene expression and personalized medicine in sepsis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):242–243. doi: 10.1016/S2213- 2600 (16)00068-0
- Davenport E.E., Burnham K.L., Radhakrishnan J., et al. Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2016;4:259–71.
- Giamarellos-Bourboulis E.J., Opal S.M. The role of genetics and antibodies in sepsis. *Ann Transl Med*. 2016;4(17):328. doi: 10.21037/atm.2016.08.63



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.008>



Галиновская Н.В.¹, Никифорова О.Л.¹✉, Воропаев Е.В.¹, Козлов А.Е.², Осипкина О.В.¹, Барбарович А.А.¹

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Гомельская областная лаборатория аналитического контроля Республиканского центра аналитического контроля в области охраны окружающей среды, Гомель, Беларусь

Значимость оценки параметров системного воспаления и эндотелиальной дисфункции у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Галиновская Н.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, редактирование текста; Никифорова О.Л. – сбор материала, статистическая обработка данных, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Воропаев Е.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование текста; Козлов А.Е. – лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов; Осипкина О.В. – лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов; Барбарович А.А. – сбор материала, статистическая обработка данных, написание текста.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина» подпрограммы 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки»: «3.38 Разработать алгоритм прогнозирования пост-COVID-19 ассоциированной патологии на основании изучения клинко-лабораторных и функциональных показателей 2022–2024 гг.».

Подана: 15.04.2025

Принята: 12.09.2025

Контакты: nikiforova.o.l@yandex.ru

Резюме

Введение. Патогенез симптомов состояния после инфекции COVID-19, характеризующегося снижением качества жизни и ростом нетрудоспособности, остается недостаточно понятным в связи с отсутствием объективных параметров его оценки. Учитывая роль эндотелиальной дисфункции (ЭД) в формировании сосудистых заболеваний, предполагается ее участие в патогенезе состояния после перенесенной инфекции COVID-19.

Цель. Оценить значимость определения уровня воспалительных маркеров, концентрации нитрат- и нитрит-ионов (NO_x) и параметров антиоксидантного статуса плазмы венозной крови у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19.

Материалы и методы. За период 2023–2024 гг. обследовано 137 пациентов (муж. – 42, жен. – 95, средний возраст – 52 г. [46; 58]), перенесших инфекцию COVID-19: 98 составили контингент лиц с длительным сохранением жалоб, 39 – лица, не предъявлявшие жалоб. После заполнения чек-листа всем пациентам определены показатели концентрации NO_x , системного воспаления: интерлейкинов (IL) IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, С-реактивного белка (CRP), фактора некроза опухоли α (TNF- α), трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), прокальцитонина (PCT), общей антиоксидантной емкости плазмы (Т-АОС), активности супероксиддисмутазы (SOD) в разные периоды времени после перенесенной пациентами инфекции COVID-19.

Результаты. У всех пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, уровень параметров системного воспаления (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , CRP, PCT) не превышал

верхнюю границу нормальных значений в различные периоды измерения. В группе лиц с отсутствием жалоб спустя более 6 месяцев после заболевания отмечен более низкий уровень IL-4 ($p_{MW}=0,0013$), IL-10 ($p_{MW}=0,014$), PCT ($p_{MW}=0,036$). Показатели антиоксидантной защиты не выходили за диапазон нормальных значений и не имели различий в исследованных группах пациентов и по периодам. Концентрация NO_x плазмы крови у пациентов с клиническими проявлениями состояния после инфекции COVID-19 в позднем периоде исследования была значимо выше, чем у пациентов с отсутствием признаков данного состояния ($p=0,0013$), и имела связь с наличием клинических проявлений состояния после инфекции COVID-19 ($p=0,002$).

Заключение. Концентрация NO_x плазмы крови у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, может служить объективным признаком нарушения функции эндотелия.

Ключевые слова: состояние после COVID-19, нитрат- и нитрит-ионы, антиоксидантная емкость, активность супероксиддисмутазы

Halinouskaya N.¹, Nikiforova O.¹✉, Voropaev E.¹, Kazlou A.², Osipkina O.¹, Barbarovich A.¹

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² Gomel Regional Laboratory of Analytical Control of the Republican Center for Analytical Control in the Field of Environmental Protection, Gomel, Belarus

Significance of Systemic Inflammation and Endothelial Dysfunction Parameters in Patients with Post-COVID-19 Condition

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Halinouskaya N. – study concept and design, analysis and interpretation of results, text editing; Nikiforova O. – data collection, statistical data processing, analysis and interpretation of results, text writing; Voropaev E. – study concept and design, text editing; Kazlou A. – laboratory research, analysis and interpretation of results; Osipkina O. – laboratory research, analysis and interpretation of results; Barbarovich A. – data collection, statistical data processing, text writing.

Funding: the work was carried out within the framework of the State Scientific Research Program 4 "Translational Medicine" subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science": "3.38 To create an algorithm for predicting post-COVID-19 associated pathology based on the study of clinical, laboratory and functional indicators for 2022–2024".

Submitted: 15.04.2025

Accepted: 12.09.2025

Contacts: nikiforova.o.l@yandex.ru

Abstract

Introduction. The pathogenesis of post-COVID-19 symptoms, which lead to decreased quality of life and increased disability, remains poorly understood due to the lack of objective parameters. Given the role of endothelial dysfunction (ED) in vascular diseases patterning, its involvement in the pathogenesis of post-COVID-19 symptoms is hypothesized.

Purpose. To assess the significance of inflammatory markers level, nitrate and nitrite ion (NO_x) concentrations, and venous blood plasma antioxidant status parameters in patients with post-COVID-19 condition.

Materials and methods. During the period 2023–2024, a total of 137 patients (42 men, 95 women, aged 52 [46; 58] years) who underwent COVID-19 infection were examined: 98 subjects with long-term complaints, and 39 subjects with no complaints. After filling



out the checklist, all patients were assessed for NOx concentration, systemic inflammation indicators: interleukins (IL) IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor α (TNF- α), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), procalcitonin (PCT), total antioxidant capacity of plasma (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) activity at different periods of time after COVID-19 infection.

Results. In all patients who underwent COVID-19 infection, the level of systemic inflammation parameters (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , CRP, PCT) did not exceed the upper limit of normal values at different periods of measurement. Lower levels of IL-4 ($p_{MW}=0.0013$), IL-10 ($p_{MW}=0.014$), and PCT ($p_{MW}=0.036$) were observed in the group of subjects with no complaints after 6 months. Antioxidant protection indicators did not exceed the normal values range and did not differ between groups and periods. Blood plasma NOx concentrations in patients with clinical manifestations of post-COVID-19 condition in the late period of the study were significantly higher than in patients with no signs of this condition ($p=0.0013$) and correlated with the presence of clinical manifestations of post-COVID-19 condition ($p=0.002$).

Conclusion. Plasma NOx concentrations in patients who recovered from COVID-19 infection can serve as an objective indicator of ED.

Keywords: post-COVID-19 status, nitrate-nitrite ions, antioxidant capacity, superoxide dismutase activity

■ ВВЕДЕНИЕ

В марте 2020 года Всемирной организацией здравоохранения была объявлена пандемия новой коронавирусной инфекции, ассоциированной с вирусом SARS-CoV-2 семейства Coronaviridae (коронавирус-2, вызывающий острый респираторный синдром) [1, 2]. Целью ученых ряда стран в этот период времени стало активное изучение как самого вируса SARS-CoV-2 и его свойств, так и ассоциированных с ним заболеваний и отдаленных последствий перенесенной инфекции. Было выявлено прямое или опосредованное влияние вируса SARS-CoV-2 на различные органы и системы организма [3]. В настоящее время продолжается активное изучение состояния иммунной системы и ее ответа на инфицирование вирусом SARS-CoV-2, а также предикторов возникновения осложнений и пост-COVID-19 синдрома.

У ряда пациентов после перенесенной инфекции COVID-19 сохранялись имеющиеся или возникали *de novo* длительно проявляющиеся симптомы, совокупность которых получила название «состояние после инфекции COVID-19» [4, 5]. Greenhalgh T. и Shah W. с соавторами выделили в состоянии после инфекции COVID-19 две категории: long-COVID с длительностью симптомов от 4 до 12 недель и непосредственно сам постковидный синдром с продолжительностью нарушений более 12 недель [6, 7]. Chung Y. и соавторы среди факторов риска развития состояния после инфекции COVID-19 выделяют тяжелое течение инфекции COVID-19, наличие коморбидных заболеваний – таких как ожирение, сахарный диабет 2-го типа, бронхиальная астма, гипотиреоз, депрессия [8].

Четких диагностических критериев состояния после инфекции COVID-19, принятых большинством клиницистов, в настоящее время нет; данные по его распространенности в популяции в источниках литературы варьируют от 30 до 60% [5, 9–11].

Единое мнение ученых о возникновении и сохранении клинических симптомов состояния после инфекции COVID-19 к настоящему времени также отсутствует [5, 12]. Bathia G.E-S., Yin K. и Molnar T. с соавторами среди патогенетических механизмов, участвующих в развитии состояния после инфекции COVID-19, отмечают следующие: стойкий системный воспалительный ответ, клеточный дисметаболизм с нарушением функций митохондрий, персистенцию вируса SARS-CoV-2, реактивацию латентных вирусов, изменение микробиома пациента, активацию аутоиммунных механизмов, изменение коагуляционных характеристик крови [5, 13]. Одной из причин длительно сохраняющихся симптомов или появившихся новых, ранее не отмеченных, является системное воспаление [11] и ЭД [14]. К потенциальным триггерам состояния после инфекции COVID-19 Vojdani A. с соавторами отнесли усиление окислительного повреждения и снижение антиоксидантной защиты, нарушение микрососудистой регуляции, активацию каскада интерферонов, нарушение иммунной регуляции, генетическую предрасположенность, коморбидные заболевания пациента (сахарный диабет, ожирение, заболевания легких) [155].

Majumder N. и Zendelovska D. также активно изучали антиоксидантный статус и его роль в патофизиологии окислительно-восстановительного дисбаланса во время острого процесса инфекции COVID-19. В результате проведенного многофакторного анализа учеными были получены значительно более высокие уровни многих воспалительных и сосудистых маркеров у пациентов с тяжелым течением, госпитализированных в отделение интенсивной терапии, по сравнению с пациентами, не находящимися в отделении интенсивной терапии [16, 17]. Majumder N. и Zendelovska D. с соавторами предложили использовать показатели окислительного стресса в качестве предикторов тяжелого течения инфекции COVID-19, но в практическом здравоохранении данный методический подход в прогнозировании тяжести заболевания не нашел широкого использования.

Главным патогенетическим механизмом возникновения и длительного сохранения клинических симптомов состояния после инфекции COVID-19 авторы настоящего исследования считают дисфункцию эндотелия и сопровождающий его окислительно-восстановительный дисбаланс, который проявляется в снижении антиоксидантной активности плазмы крови. Одним из главных патогенетических механизмов ЭД является нарушение метаболизма монооксида азота (нитрат-ионы) (NO_x), который может выступать как медиатор воспаления [18]. Монооксид азота (NO), образующийся в эндотелиальных клетках и клетках иммунной системы (нейтрофилы), метаболизируется в организме до NO_x [19]. При патологических состояниях организма, которые сопровождаются хроническим воспалительным процессом, а также стрессе, онкологических заболеваниях концентрация NO_x в сыворотке крови увеличивается [19, 20]. Сосудистая дисфункция и нарушение биодоступности защитного оксида азота (NO) имеют решающее значение в прогрессировании таких заболеваний, как хронические обструктивные заболевания легких (ХОБЛ), сердечно-сосудистые заболевания, артериальная гипертензия, а также в реализации состояния после инфекции COVID-19 [21, 22].

Диагностическими маркерами ЭД являются помимо уровня NO_x ангиотензин II, гомоцистеин, простациклин. Однако доступность этих маркеров в рутинной клинической практике сильно различается. Определение простациклина в повседневной клинической практике сопряжено со сложностями ввиду нестабильности данного



метаболита [23]. Сложность определения ангиотензина II связана с его низкой концентрацией в плазме, коротким периодом полураспада и наличием структурно схожих пептидов, что требует использования высокотехнологичных методов, недоступных для рутинной лаборатории [24]. В противовес этому существуют стандартизированные методики определения NO_x и гомоцистеина. Для гомоцистеина характерна низкая специфичность [25, 26]. В свою очередь, изменение концентрации NO_x , отражая состояние ЭД, является более чувствительным маркером нарушения функции эндотелия [27].

Ранее проводилось изучение концентрации NO_x у пациентов в остром периоде инфекции COVID-19 и была показана их роль как возможного предиктора тяжести заболевания [8, 22]. Авторы настоящего исследования задались целью определить возможное наличие взаимосвязи между развитием состояния после инфекции COVID-19, нарушением функции эндотелия и антиоксидантным статусом пациентов.

Евсеенко Д.А. и соавторы в своем исследовании определяют антиоксидантный статус как комплексную динамичную гомеостатическую систему организма, определяющую такие параметры, как развитие, течение и исход заболевания [28]. В живом организме про- и антиоксидантные системы представлены ферментными и неферментными составляющими. Одним из ферментных антиоксидантов, вырабатываемых в организме и тормозящих перекисное окисление липидов и белков, является супероксидаза (SOD), которая присутствует во всех тканях организма человека [29]. Не менее важным для определения антиоксидантного статуса организма служит Т-АОС, которая включает в себя сочетанное влияние каталазы, SOD, глутатиона, витаминов С и Е (альфа-токоферола).

Таким образом, определение отдельных компонентов антиоксидантного статуса и маркеров ЭД методами, доступными широкой медицинской практике, может способствовать прогнозированию сохранения симптомов состояния после инфекции COVID-19 и использованию их для определения дополнительных путей медицинской профилактики.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить значимость определения уровня воспалительных маркеров, концентрации нитрат- и нитрит-ионов (NO_x) и параметров антиоксидантного статуса плазмы венозной крови у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования: на первом этапе – поперечное сплошное, на втором – проспективное одноцентровое когортное исследование.

Исследование проводилось на базе государственного учреждения здравоохранения «Гомельская центральная городская клиническая поликлиника», филиал № 12 и научно-исследовательской лаборатории (НИЛ) учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» (УО «ГомГМУ»).

Критериями включения в исследование были: перенесенная инфекция COVID-19 в легкой и средней степени тяжести, возраст ≥ 18 лет, наличие добровольного информированного согласия, одобренного этическим комитетом УО «ГомГМУ» (протокол № 5 от 14.12.2021).

Критериями исключения являлись: возраст <18 лет, отсутствие информированного согласия и других критериев включения, наличие других заболеваний нервной, костно-мышечной системы, проявлением которых могли быть выявленные нарушения проантиоксидантного статуса, иные инфекционные заболевания и психические расстройства.

При проведении исследования у всех пациентов было получено добровольное информированное согласие.

Основную группу наблюдения составили пациенты, которые перенесли инфекцию COVID-19 и у которых возникли de novo или сохранялись более 4 недель после перенесенной острой инфекции жалобы разного характера. В состав основной группы вошли 98 чел. (72% от всего контингента исследованных лиц), из них женщины составили 77% (75 чел.) с медианой возраста 55 лет [48; 58], мужчины – 23% (23 чел.) с медианой возраста 55 лет [48; 58].

Основная группа наблюдения была подразделена на три подгруппы в зависимости от срока давности перенесенной COVID-инфекции: пациенты первой подгруппы перенесли инфекцию COVID-19 от 1 до 3 месяцев тому назад, второй – от 3 до 6 месяцев, третьей – более полугода. Половозрастная характеристика пациентов этих подгрупп представлена в табл. 1.

Группу сравнения составили 28% (39 чел.) пациентов – из лиц, перенесших инфекцию COVID-19 и не предъявлявших жалоб в последующем.

Диагноз инфекции COVID-19 был подтвержден методом полимеразной цепной реакции с обнаружением генетического материала SARS-CoV-2 у 96% (132) пациентов; методом экспресс-теста – у 4% (5) пациентов.

Состояние после инфекции COVID-19 чаще возникало у женщин в возрасте старше 50 лет, что соотносится с данными, описанными в источниках литературы последних лет [30].

Распределение сопутствующих заболеваний у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, представлено в табл. 2.

Наиболее часто среди факторов преморбидного фона состояния после инфекции COVID-19 встречались артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность, заболевания щитовидной железы, дегенеративно-дистрофические заболевания опорно-двигательного аппарата, заболевания почек и ожирение. В группе сравнения эти же заболевания встречаются несколько реже по сравнению с основной группой.

Таблица 1
Половозрастная характеристика основной группы наблюдения
Table 1
Age and gender characteristics of the main observation group

Пол	1-я подгруппа		2-я подгруппа		3-я подгруппа	
	Количество	Med [LQ; UQ]	Количество	Med [LQ; UQ]	Количество	Med [LQ; UQ]
Мужчины	7	50 [41; 60]	13	51 [47; 54]	3	55 [52; 55,5]
Женщины	32	56 [41; 64,3]	38	53,5 [49,3; 56]	5	56 [51; 56]
Всего	39	56 [41; 64]	51	52 [49; 56]	8	55,5 [50,5; 56]



Таблица 2

Характеристика сопутствующих заболеваний у пациентов основной группы и группы сравнения

Table 2

Characteristics of concomitant diseases in patients of the main and comparison groups

Группа	Основная			Сравнения		
Заболевание	Общая, %	Мужчины, %	Женщины, %	Общая, %	Мужчины, %	Женщины, %
Ишемическая болезнь сердца	20	9	24	20	26	17
Инфаркт миокарда	20	–	33	5	17	–
Малые аномалии развития сердца	10	4	12	9	7	10
Нарушение ритма сердца	18	4	23	13	11	14
Хроническая сердечная недостаточность	20	5	24	11	15	10
Артериальная гипертензия	52	43	55	43	41	45
Заболевания нервной системы	60	48	64	46	33	52
Цервикалгия	19	–	25	20	11	24
Люмбалгия	29	35	27	23	15	29
Хронический гастрит	24	9	28	24	15	29
Стеатогепатоз	16	26	13	6	4	7
Липоматоз поджелудочной железы	14	22	12	4	4	5
Сахарный диабет	5	9	4	4	4	5
Заболевания щитовидной железы	41	26	45	26	19	29
Ожирение	28	35	25	11	11	12
Заболевания соединительной ткани	20	17	21	10	7	12
Первичный полиостеоартрит	23	13	27	11	7	14
Заболевания почек	32	22	35	30	30	31
Злокачественное новообразование в анамнезе	11	4	13	10	–	17

Взятие венозной крови из кубитальной вены осуществлялось утром натощак в обработанные этилендиамином одноразовые пробирки, после чего биологический материал непосредственно доставлялся в НИЛ УО «ГомГМУ», где образцы плазмы крови после их получения и до постановки тестов хранились при -80°C .

Определение активности SOD производилось по методу Т.В. Сироты, основанному на способности фермента влиять на скорость реакции автоокисления адреналина гидрохлорида [31]. В измерительную кювету с 2 мл 0,2 моль/л карбонатного буфера (рН 10,55) вносилось 0,1 мл раствора адреналина гидрохлорида, перемешивалось, и регистрировалось автоокисление адреналина на спектрофотометре при длине волны 347 нм. Изменение оптической плотности в единицу времени оценивалось как скорость реакции автоокисления адреналина. Затем измерялся этот же показатель

при внесении в тест-систему плазмы крови. Процент ингибирования или активации реакции в присутствии плазмы крови вычислялся по формуле:

$$\% \text{ ингибирования (е. а.)} = [1 - (\Delta E \text{ опыт} / \Delta E \text{ контроль})] \times 100\%,$$

где ΔE опыт и ΔE контроль – изменения оптической плотности, отражающей скорость реакции автоокисления адреналина в опытной и контрольной пробах соответственно, в присутствии и при отсутствии плазмы крови.

Способность к ингибированию автоокисления адреналина оценивалась как активность SOD плазмы крови, выраженная в условных единицах – в единицах активности (е. а.).

Перед выполнением анализа на предмет определения уровня NO_x плазмы крови образцы размораживались при 4 °C, после чего подвергались центрифугированию (10 000 g, 10 мин., 4 °C). Определение суммарной концентрации NO_x в плазме крови выполнялось колориметрическим методом с реактивом Грисса и предварительным переводом нитрат-ионов в нитрит-ионы нитратредуктазой (использовался коммерческий набор реагентов фирмы Invitrogen Catalog Number: EMSNO) в соответствии с инструкцией производителя. Предварительно образцы плазмы разбавлялись в 8 раз раствором-разбавителем из состава набора. Для выполнения определения использовалось необходимое оборудование, имевшееся в НИЛ УО «ГомГМУ»: центрифуга, микропланшетный термощейкер, микропланшетный ридер-фотометр. Суммарная концентрация NO_x в образцах рассчитывалась в программном обеспечении Magellan V7.2 (Tecan, Austria, GmbH) по калибровочной кривой (0–100 мкМ нитрат-ионов) и с учетом примененного разведения исходных образцов.

Общая антиокислительная активность (Т-АОС) определялась колориметрическим методом с использованием коммерческой тест-системы (Elabscience Total Antioxidant Capacity Colorimetric Assay Kit, Catalog No: E-BC-K136-S). Постановка теста осуществлялась в соответствии с инструкцией производителя в собственной модификации и предусматривала постановку с каждым образцом двух вариантов теста (Sample plate и Control plate). В обоих вариантах постановки теста каждый образец анализировался дважды.

Методом иммуноферментного анализа с применением микропланшетного фотометра SunriseTecan (Австрия) определялись концентрации IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, высокочувствительного CRP, TNF- α , TGF- β 1 и PCT, для чего использовался набор реагентов «ИФА-БЕСТ» (производства ВЕКТОР-БЕСТ, Российская Федерация). Значения показателей тестов, принимаемые за нормальный диапазон, были указаны в инструкции: IL-1 β – 2,0 нг/л (0–11 нг/л); IL-4 – 1,0 нг/л (0–4 нг/л); IL-6 – 2,0 нг/л (0–10 нг/л); для IL-8 – 2,0 нг/л (0–10,0 нг/л); IL-10 – 5,0 нг/л (0–31,0 нг/л); TNF- α – 0,5 нг/л (0–6,0 нг/л); уровень CRP – 8 мг/л (0–10 мг/л); PCT – 0,04 нг/л (0–0,05 нг/л).

Результаты исследования были внесены в обезличенную базу и подвергнуты анализу с помощью пакета программ STATISTICA 10.0. Для анализа количественных данных определялось их распределение с применением теста Шапиро – Уилка. Отличающиеся от нормального распределения результаты представлялись в виде медианы (Me), верхнего и нижнего 75% процентилей (LQ–UQ).

Для оценки различий количественных признаков двух независимых групп с ненормальным распределением использовали U-критерий Манна – Уитни (MW),



при множественных сравнениях – Краскела – Уоллиса (KW). К достоверным различиям отнесено значение $p < 0,05$. Наличие связи определяемых параметров и состояния после инфекции COVID-19 определялось с помощью множественной регрессии. Прогностическая значимость NO_x определялась посредством построения ROC-кривой. Для определения оптимального порога отсечения значений показателей применяли метод Йодена. Сравнение площадей под ROC-кривыми (AUC) осуществляли с помощью теста Де Лонга. При значении AUC, равном 0,9–1,0, качество модели оценивалось как отличное, 0,8–0,9 – как очень хорошее, 0,7–0,8 – как хорошее, 0,6–0,7 – как среднее, 0,5–0,6 – неудовлетворительное. Для подготовки иллюстрации был использован язык программирования R.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр предъявляемых жалоб у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19 представлен в табл. 3 в соответствии с периодом давности перенесенной COVID-инфекции: от 1 до 3 месяцев, от 3 до 6 месяцев, более полугода.

Наиболее часто встречающиеся жалобы неспецифичны и представлены быстрой утомляемостью, слабостью, болями в суставах и позвоночнике, снижением памяти.

Учитывая данные, приведенные в источниках литературы [5, 8, 11, 12], мы предполагали участие системного воспалительного процесса в реализации клинической картины состояния после инфекции COVID-19. Вялотекущие воспалительный процесс и ЭД могли лежать в основе и наиболее часто формирующихся осложнений перенесенной инфекции COVID-19 – сахарного диабета 2-го типа, инфаркта мозга, прогрессирующей сердечной недостаточности [8, 12, 14]. Эту же гипотезу поддерживали данные об участии «цитокинового шторма» в патогенезе тяжелых форм инфекции

Таблица 3
Распространенность и степень выраженности симптомов состояния после инфекции COVID-19 у пациентов с разной степенью давности перенесенной COVID-19-инфекции
Table 3

Prevalence and severity of symptoms after COVID-19 infection in patients with varying degrees of duration of COVID-19 infection

Жалобы	1-й период				2-й период				3-й период			
	%	легкие	умеренные	выраженные	%	легкие	умеренные	выраженные	%	легкие	умеренные	выраженные
Слабость	39	36	3	–	34	24	10	–	15	–	15	–
Усталость	18	10	5	3	20	6	14	–	–	–	–	–
Быстрая утомляемость	59	23	36	–	55	18	35	2	57	43	14	–
Нарушение сна	31	23	8	–	22	8	14	–	14	14	–	–
Снижение памяти	28	23	5	–	28	20	8	–	29	29	–	–
Головная боль	18	15	3	–	14	14	–	–	–	–	–	–
Одышка	18	5	13	–	28	18	10	–	–	–	–	–
Колебания АД	18	15	3	–	8	4	4	–	14	14	–	–
Боли в суставах	51	43	8	–	53	37	14	2	86	72	14	–
Боли в позвоночнике	15	13	2	–	8	6	2	–	43	29	14	–

COVID-19. Для анализа этой гипотезы было проведено исследование концентрации IL, TNF- α , PCT, TGF- β 1 и CRP, параметров антиоксидантной защиты, уровня NO $_x$ у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, с сохраняющимися жалобами и без таковых в различные временные периоды.

Лабораторные данные, полученные при выполнении первого этапа исследования, представлены в табл. 4: в соответствии с периодом давности перенесенной COVID-инфекции пациентами, впервые включенными в исследование.

Таблица 4
Результаты лабораторных исследований плазмы крови пациентов с разной степенью давности перенесенной COVID-19-инфекции
Table 4
Results of blood plasma laboratory tests of patients with different degrees of duration of COVID-19 infection

Параметр	1-й период	2-й период	3-й период	p _{KW}
Основная группа / группа сравнения	Med [LQ; UQ]			
NO $_x$, мкмоль/л	200 [100; 311,1]	222,2 [42,9; 288,9]	150 [133,3; 160]	p=0,58
NO $_x$, мкмоль/л	214,3 [39,3; 288,9]	155,8 [112; 387,9]	12,6 [11,6; 19,5]*, **	p=0,0000
T-AOC, Ед/мл	5,6 [4,9; 7,7]	5,4 [2,8; 7,8]	5,7 [2,8; 8,4]	p=0,41
T-AOC, Ед/мл	6,1 [3,8; 9,9]	4,6 [4,1; 8,6]	5,1 [3,6; 8,8]	p=0,66
SOD, Ед/мл	1,3 [1,1; 1,7]	1,2 [1,1; 1,6]	1,3 [1,1; 1,4]	p=0,58
SOD, Ед/мл	1,3 [1,2; 1,4]	1,4 [1,1; 1,7]	1,3 [1,2; 1,4]	p=0,9
IL-1 β , нг/л	0,2 [0; 0,9]	0 [0; 0,8]	0,2 [0; 0,5]	p=0,73
IL-1 β , нг/л	0,9 [0; 2,2]	0,3 [0; 1]	0 [0; 1,3]	p=0,18
IL-4, нг/л	0,2 [0; 0,6]	0 [0; 0,7]	0 [0; 0,3]	p=0,38
IL-4, нг/л	0,5 [0,2; 0,9]	0 [0; 1]	0 [0; 0,2]*	p=0,0013
IL-6, нг/л	2,1 [1,5; 3,2]	3,1 [2; 4,6]	2,9 [2,1; 4,1]	p=0,06
IL-6, нг/л	1,9 [1,2; 3,2]	2 [1,2; 3,9]	2,1 [1,6; 3,4]	p=0,56
IL-8, нг/л	3,6 [2,7; 4,9]	4 [2,8; 5,5]	4,3 [3,8; 6,1]	p=0,33
IL-8, нг/л	3,8 [2,8; 4,5]	3,4 [2,5; 5,7]	3 [2,2; 4,9]	p=0,52
IL-10, нг/л	3,7 [2,9; 5]	3,1 [2,4; 5]	3 [2,1; 4,6]	p=0,37
IL-10, нг/л	3,4 [2,9; 4,4]	3,7 [2,7; 5,6]	2,3 [0,8; 4,1]*	p=0,014
CRP, мг/л	2,1 [0,9; 5,4]	2 [0,9; 3,7]	2,2 [0,9; 11,8]	p=0,8
CRP, мг/л	2,2 [0,5; 3,7]	2,3 [1,6; 8]	2,8 [1,4; 9,3]	p=0,26
TNF- α , мкг/л	1,9 [1,1; 3,1]	1,3 [0,8; 1,8] *	1,7 [0,9; 2,3]	p=0,012
TNF- α , мкг/л	2,2 [1,7; 3,2]	1,8 [1,4; 2,5]	0,5 [0; 1,7]*, **	p=0,0002
TGF- β 1, мкг/л	2391 [1850,9; 2589,2]	1960,1 [1846,3; 2430,8]	2250,8 [1916,2; 2604,6]	p=0,12
TGF- β 1, мкг/л	2463 [1920,2; 3059,4]	1996 [1884,2; 2226,6] *	2272 [1351,3; 2861,8]	p=0,05
PCT, мкг/л	0,05 [0,03; 0,05]	0,02 [0,01; 0,03] *	0,04 [0,02; 0,07]	p=0,0004
PCT, мкг/л	0,05 [0,03; 0,06]	0,03 [0,01; 0,05]	0,04 [0,03; 0,06] **	p=0,036

Примечания: * p_{MW}<0,05 по сравнению с первым периодом наблюдения; ** p_{MW}<0,05 по сравнению со вторым периодом наблюдения.



Как следует из табл. 4, имеют место достоверные различия у пациентов с постковидным синдромом с разным сроком давности перенесенной COVID-19-инфекции по тестам: TNF- α , TGF- β 1 и PCT ($p_{MW}=0,0002$; $p_{MW}=0,05$ и $p_{MW}=0,036$ соответственно) в сравнении с аналогичными показателями у лиц группы сравнения. Эти же параметры были ниже у лиц основной группы во втором периоде наблюдения: TNF- α , TGF- β 1 и PCT ($p_{MW}=0,012$; $p_{MW}=0,05$ и $p_{MW}=0,0004$ соответственно), однако в третьем периоде изучаемые параметры не имели отличий от начальных.

Также в группе с отсутствием жалоб имели место более низкие значения концентрации IL-4 и IL-10 в третьем периоде наблюдения ($p_{MW}=0,0013$ и $p_{MW}=0,014$ соответственно).

Значения концентраций показателей антиоксидантного статуса, такие как SOD и T-AOC, не выявили достоверных различий у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19 и без него.

Значения концентрации NO $_x$ в плазме крови пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 в разные временные интервалы со времени перенесенного заболевания, представлены нами на рис. 1.

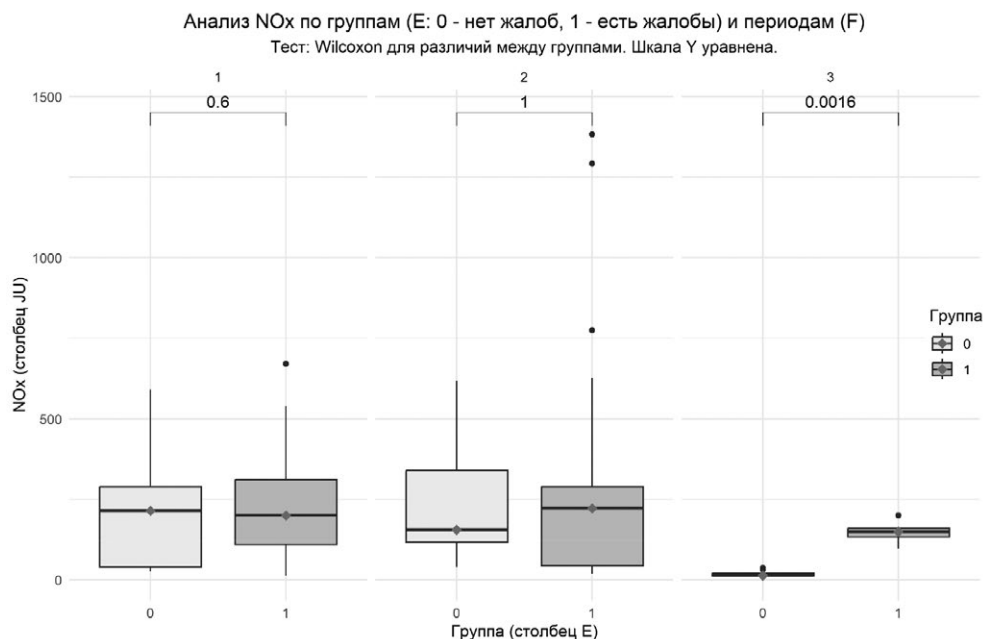


Рис. 1. Распределение NO $_x$ у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 в разные периоды времени, в основной группе и группе сравнения: 0 – пациенты, перенесшие инфекцию COVID-19 без жалоб; 1 – пациенты с состоянием после инфекции COVID-19. Периоды указаны в верхней части рисунка: 1 – от 1 до 3 месяцев; 2 – от 3 до 6 месяцев; 3 – более 6 месяцев, AUC=0,656; $p_{MW}=0,002$

Fig. 1. Distribution of NO $_x$ in patients who underwent COVID-19 infection at different periods of time in the main group and the comparison group: 0 – patients after COVID-19 infection with no complaints; 1 – patients with post-COVID-19 condition. The periods are indicated at the top of the figure: 1 – from 1 to 3 months; 2 – from 3 to 6 months; 3 – more than 6 months, AUC=0.656; $p_{MW}=0.002$

Из приведенной диаграммы следует, что уровень NO_x у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 в первое полугодие после острого периода заболевания, сохранялся на одном уровне, в четыре раза превышая верхние границы нормального интервала (5–90 мкмоль/л). Этот факт может свидетельствовать о наличии в изучаемых группах признаков ЭД [20, 22].

В третьем периоде наблюдалось значительное уменьшение показателей данного параметра ($p=0,001$) только лишь у лиц с отсутствием жалоб.

Таким образом, исходя из приведенных значений анализируемых параметров, нами был выявлен показатель, объективно указывающий на патофизиологическую основу сохранения жалоб у пациентов с состоянием после инфекции COVID-19.

Интегральное уравнение множественной регрессии для трех медиаторов – ЭД, NO_x и антиоксидантного статуса (SOD, T-AOC) – имело следующий вид:

$$\text{Наличие жалоб} = 0,117 \times \text{AOE} - 0,36 \times \text{NO} - 0,07 \times \text{SOD}$$

$$R=0,4077 \quad R^2=0,1662 \quad \text{Adjusted } R^2 = 0,1500$$

$$F=10,23 \quad p=0,000003 \quad N=158$$

Модель статистически значима, но имеет ограниченную практическую полезность из-за низкой объясняющей способности. NO_x является единственным сильным предиктором.

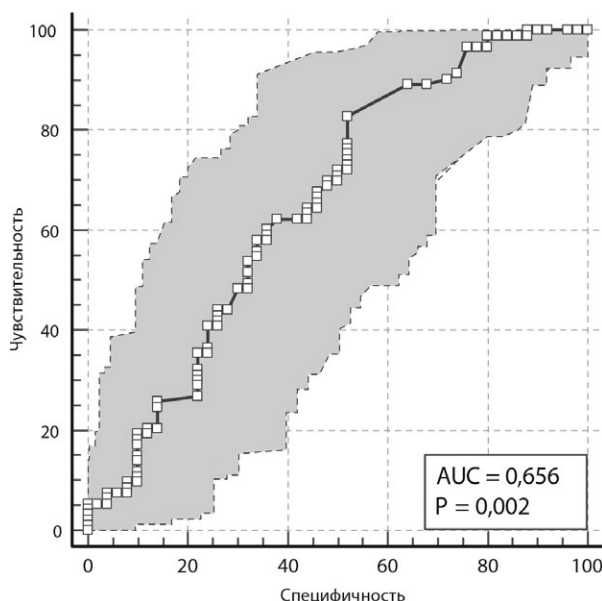


Рис. 2. Влияние концентрации NO_x на формирование проявлений симптомов после инфекции COVID-19 (AUC 0,656; 95% ДИ нижняя граница 0,556; 95% ДИ верхняя граница 0,755; оптимальный порог 41,075; чувствительность 82,8%; специфичность 48%; индекс Юдена 0,308)

Fig. 2. NO_x concentration's effect on the onset of post-COVID-19 symptoms manifestations (AUC 0.656; 95% CI lower limit 0.556; 95% CI upper limit 0.755; optimal threshold 41.075; sensitivity 82.8%; specificity 48%; Youden index 0.308)



Учитывая тот факт, что наибольший коэффициент регрессии был получен нами для NO_x , дальнейший анализ прогностической значимости проводился нами для этого параметра.

Построение ROC-кривой выявило влияние концентрации NO_x на формирование проявлений состояния после инфекции COVID-19 с диагностической чувствительностью 83% и диагностической специфичностью 48% (рис. 2).

Высокая диагностическая чувствительность NO_x , установленная в ходе выполнения анализа, была более значима, чем диагностическая специфичность, так как рядом исследований была доказана роль NO_x в возникновении эндотелиальной дисфункции, которая является главным патогенетическим механизмом в возникновении состояния после инфекции COVID-19 [22].

Результаты проведенного исследования показали, что уровень про- и противовоспалительных цитокинов не превышал пределы нормальных интервалов, независимо от наличия жалоб у пациентов, что отклоняло гипотезу о значительном влиянии системного воспаления на клиническую картину состояния после инфекции COVID-19. Между тем в группе пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 и не имеющих жалоб, наблюдался несколько меньший уровень концентрации IL-4, IL-10, РСТ в третьем периоде наблюдения. Показатели прооксидантно-антиоксидантного статуса не имели существенных различий и на вероятность возникновения жалоб у пациентов не влияли. Наибольшей значимостью в оценке состояния после перенесения COVID-19-инфекции обладал тест определения концентрации NO_x в плазме венозной крови. Этот параметр имел существенно более низкие значения в группе пациентов без клинической картины проявления патологии в третьем периоде наблюдения, в котором он не превышал значения здоровых лиц.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило предложить использование теста определения концентрации NO_x в плазме венозной крови в качестве объективного показателя, указывающего на формирование эндотелиальной дисфункции у пациентов с состоянием после COVID-19, что в свою очередь может способствовать оптимизации отбора лиц, перенесших COVID-19-инфекцию, для проведения вторичной медицинской профилактики.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. COVID-19. Overview and Recommendations. DynaMed. Available at: <https://www.dynamed.com/condition/covid-19#GUID-C851C3C1-5E99-495E-A831-3BF27FC59059> (accessed April 18, 2025).
2. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S. et al. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*. 2020;5(4):536–544. doi: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. Yuan Y., Jiao B., Qu L. et al. The development of COVID-19 treatment. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1125246. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125246>
4. Santana-de Anda K., Torres-Ruiz J., Mejía-Domínguez N.R. et al. Novel Clinical, Immunological, and Metabolic Features Associated with Persistent Post-Acute COVID-19 Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(17):9661. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms25179661>
5. Peluso M.J., Deeks S.G. Mechanisms of long COVID and the path toward therapeutics. *Cell*. 2024;187(20):5500–5529. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.07.054>
6. Greenhalgh T., Knight M., A'Court C. et al. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ*. 2020;370:3026. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.m3026>
7. Shah W., Hillman T., Playford E.D. et al. Managing the long term effects of COVID-19: Summary of NICE, SIGN, and RCGP rapid guideline. *BMJ*. 2021;372:136. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.n136>

8. Chung Y.S., Lam C.Y., Tan P.H. et al. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(15):8155. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms25158155>
9. Peluso M.J., Kelly J.D., Lu S. et al. Persistence, Magnitude, and Patterns of Postacute Symptoms and Quality of Life Following Onset of SARS-CoV-2 Infection: Cohort Description and Approaches for Measurement. *Open Forum Infectious Diseases*. 2022;9(2):640. doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab640>
10. Kenny G., McCann K., O'Brien C. et al. Identification of Distinct Long COVID Clinical Phenotypes Through Cluster Analysis of Self-Reported Symptoms. *Open Forum Infectious Diseases*. 2022;9(4):ofac060. doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac060>
11. Yin K., Peluso M.J., Luo X. et al. Long COVID manifests with T cell dysregulation, inflammation and an uncoordinated adaptive immune response to SARS-CoV-2. *Nature Immunology*. 2024;25(2):218–225. doi: <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01724-6>
12. Chung Y.S., Lam C.Y., Tan P.H. et al. Comprehensive Review of COVID-19: Epidemiology, Pathogenesis, Advancement in Diagnostic and Detection Techniques, and Post-Pandemic Treatment Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(15):8155. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms25158155>
13. Molnar T., Lehoczi A., Fekete M. et al. Mitochondrial dysfunction in long COVID: mechanisms, consequences, and potential therapeutic approaches. *Geroscience*. 2024;46(5):5267–5286. doi: <https://doi.org/10.1007/s11357-024-01165-5>
14. Belotserkovskaya Yu., Romanovskikh A., Smirnov I. et al. Long COVID-19. *Consilium Medicum*. 2021;23(3):261–268. (in Russ) doi: 10.26442/20751753.2021.3.200805
15. Vojdani A., Vojdani E., Saidara E. et al. Persistent SARS-CoV-2 Infection, EBV, HHV-6 and Other Factors May Contribute to Inflammation and Autoimmunity in Long COVID. *Viruses*. 2023;15(2):400. doi: 10.3390/v15020400
16. Majumder N., Deepak V., Hadique S. et al. Redox imbalance in COVID-19 pathophysiology. *Redox Biology*. 2022;56:102465. doi: 10.1016/j.redox.2022.102465
17. Zendelevska D., Atanasovska E., Petrushevska M. et al. Evaluation of oxidative stress markers in hospitalized patients with moderate and severe COVID-19. *Romanian Journal Internal Medicine*. 2021;59(4):375–383. doi: 10.2478/rjim-2021-0014
18. Somova L., Plekhova N. Nitric oxide as a mediator of inflammation. *Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 2006;2:77–80. (in Russian) Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/oksid-azota-kak-mediator-vospaleniya> (accessed April 18, 2025).
19. El Boghdady N.A., Badr G.A. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy. *Cell Biochemistry and Function*. 2012;30(4):328–334. doi: 10.1002/cbf.2808
20. Starodubtseva M., Voropayev E., Petrenyov D. et al. Nitrite and nitrate ion distribution in blood of men from Gomel region depending on oncomarker concentration (prostate specific antigen, cancer antigen 19-9, carcinoembryonic antigen and alpha fetoprotein). *Health and Ecology Issues*. 2014;4:101–106. (in Russian) doi: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2014-11-4-19>
21. Halinowskaya N., Smychek V. *Transient cerebrovascular accidents: features of pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic and treatment possibilities*. Gomel: GomGMU; 2019. (in Russian)
22. Wang J., Mei F., Bai L. et al. Serum nitrite and nitrate: A potential biomarker for post-covid-19 complications? *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;175:216–225. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.237
23. Kortz L., Dorow J., Ceglarek U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;1;964:1–11. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.046
24. Maurer J., de Groot A., Martin L. et al. Quantification of endogenous Angiotensin 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, and 1-5 in human plasma using micro-UHPLC-MS/MS: Outlining the importance of the pre-analytics for reliable results. *J Pharm Biomed Anal*. 2024;15;243:116101. doi: 10.1016/j.jpba.2024.116101
25. Yuan D., Chu J., Lin H. et al. Mechanism of homocysteine-mediated endothelial injury and its consequences for atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2023;16;9:1109445. doi: 10.3389/fcvm.2022.1109445
26. Emrich I.E., Obeid R., Geisel J. et al. Association of Homocysteine, S-Adenosylhomocysteine and S-Adenosylmethionine with Cardiovascular Events in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*. 2025;10;17(4):626. doi: 10.3390/nu17040626
27. Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):156–67. doi: 10.1038/nrd2466
28. Evseenko D., Dundarov Z., Chueshova N. et al. Unity of criteria of antioxidant status before treatment of patients with liver cirrhosis and acute blood loss. *Health and Ecology Issues*. 2024;21(4):37–44. (in Russian) doi: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-4-04>
29. Nikitina O., Darenskaya M., Semenova N. et al. Antioxidant defense system: regulation of metabolic processes, genetic determinants, methods of determination. *Siberian Scientific Medical Journal*. 2022;42(3):4–17. (in Russian) doi: <https://doi.org/10.18699/SSMJ20220301>
30. Nikiforova O., Galinowskaya N., Voropaev E. et al. Prevalence of symptoms of COVID-19 infection 9 months after the disease in mild and moderate forms in an outpatient condition. *Healthcare*. 2023;11(920):5–11. (accessed April 18, 2025) (in Russian) doi: https://rncmt.by/files/00106/obj/110/73733/doc/ZDRAV_23_11.pdf
31. Sirota T. Use of nitroblue tetrazolium in the reaction of adrenaline autooxidation to determine the activity of superoxide dismutase. *Biomedical Chemistry*. 2013;59(4):399–410. (in Russian) doi: 10.18097/PBMC20135904399



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.009>



Акулич Н.В.

Республиканский научно-практический центр спорта, Минск, Беларусь

Значимость лактата эритроцитов в адаптации к гипоксии при проведении нагрузочного тестирования

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 31.07.2025

Принята: 03.11.2025

Контакты: akulichn@gmail.com

Резюме

Введение. Интерпретация результатов оценки лактата при проведении тестирования часто затруднена, поскольку резкое повышение уровня лактата в крови характеризует нормальную реакцию на значительную по мощности физическую нагрузку, при этом лактат не может быть удален из крови так же быстро, как и поступил в нее.

Цель. Оценить роль лактата эритроцитов в адаптации к физической нагрузке при тестировании на велоэргометре.

Материалы и методы. Проведено тестирование общей физической работоспособности спортсменов ($n=69$) национальных команд при выполнении велоэргометрической нагрузки до отказа. Исследована кинетика лактата для определения аэробного и анаэробного порогов. Измерение концентрации лактата в капиллярной крови и эритроцитах осуществлялось электрохимическим методом, содержание эритроцитов (и других форменных элементов крови), оценка отдельных показателей эритроцитов до и после выполнения нагрузки производились с использованием автоматического гематологического анализатора.

Результаты. Проведен анализ динамики изменения концентрации лактата в капиллярной крови под влиянием физической нагрузки: в первой группе на пике нагрузки содержание лактата составляло $9,55 \pm 1,50$, во второй – $8,82 \pm 3,01$ ммоль/л ($p > 0,05$). Установлены различия между показателями концентрации лактата цельной крови и эритроцитов в группах спортсменов на уровне аэробного и анаэробного порогов. Проведение нагрузочного тестирования сопровождалось снижением средней концентрации гемоглобина в эритроците, увеличением содержания гемоглобина и показателя гематокрита, тенденцией к росту анизоцитоза.

Заключение. Проведен анализ содержания лактата цельной крови и эритроцитов спортсменов при выполнении ими нагрузочного тестирования. Установлено, что рост мощности выполняемой нагрузки обеспечивается за счет активации гликолитической системы энергообеспечения. Снижение скорости транспорта лактата в эритроцит или/и гликолиза в красных кровяных тельцах может обеспечивать лучшую работоспособность в условиях, при которых энергообеспечение реализовано преимущественно за счет анаэробного гликолиза.

Ключевые слова: лактат, эритроциты, нагрузочное тестирование, MCHC-O, апостериорная вероятность, теорема Байеса

Akulich N.

Republican Scientific and Practical Center of Sports, Minsk, Belarus

Significance of Erythrocytes Lactate in Adaptation to Hypoxia during Load Testing

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 31.07.2025

Accepted: 03.11.2025

Contacts: akulichn@gmail.com

Abstract

Introduction. Interpreting lactate assessment results in load testing is often complicated since a sharp increase in blood lactate levels is a normal response to intense physical activity, at which lactate cannot be eliminated from the blood as quickly as it entered it.

Purpose. To evaluate the role of erythrocytes lactate in adaptation to physical activity during testing on a bicycle ergometer.

Materials and methods. The general physical performance of athletes ($n=69$) of national teams was tested during bicycle ergometer exercise to exhaustion. Lactate levels in capillary blood and red blood cells were measured electrochemically, while red blood cell (and other blood cell) counts and individual red blood cell parameters before and after exercise were assessed using an automated hematological analyzer.

Results. An analysis of changes in lactate level in capillary blood under physical exertion was performed: in the first group, at the peak of the load, it was $9,55 \pm 1,50$, in the second it was $8,82 \pm 3,01$ mmol/l, $p > 0,05$. Differences were revealed between the groups in whole blood and red blood cell lactate values, at aerobic and anaerobic thresholds. During load testing, a decrease in the optical parameter of the average hemoglobin level in red blood cells, as well as an increase in platelet number, hemoglobin and hematocrit, and a tendency toward anisocytosis were observed; the average red blood cell count remained practically unchanged.

Conclusion. An analysis of whole blood and red blood cell lactate levels in athletes during load testing was carried out. It was established that an increase in load capacity was achieved through activating glycolytic energy supply systems. A decrease in the rate of lactate transport into and/or glycolysis in red blood cells may provide better performance in conditions where energy supply is mainly provided by anaerobic glycolysis.

Keywords: lactate, red blood cells, stress testing, MCHC-O, a posteriori probability, Bayes' theorem

■ ВВЕДЕНИЕ

Концентрация лактата (La^-) в крови – один из часто измеряемых показателей в клинической лабораторной практике. Тест на его определение достаточно широко используется в качестве ключевого для оценки состояния здоровья пациентов в области хирургии, в спортивной медицине, а также в пищевой промышленности [1–3].



В состоянии покоя уровень лактата в цельной крови колеблется в пределах от 0,5 до 1,5 ммоль/л, но может повышаться до 25 ммоль/л при интенсивной нагрузке [4].

Образование и утилизация лактата в организме здорового человека жестко контролируются рядом гомеостатических механизмов; от баланса La^- во многом зависит состояние кислотно-основного гомеостаза, поскольку образование молочной кислоты связано с повышением концентрации протонов внутри клеток, а утилизация лактата и восстановление бикарбоната (гидрокарбоната) необходимы для уравнивания процессов образования протонов и потребления бикарбоната [4].

Для оценки физической работоспособности пациентов в медицине и спорте применяется нагрузочное тестирование (бег по движущейся дорожке, езда на велотренажере) с определением концентрации лактата в крови. Считается [5], что преобладание аэробного способа энергообеспечения и низкая концентрация лактата в цельной крови характерны для работы низкой интенсивности, а при стимуляции анаэробного гликолиза отмечается экспоненциальный рост La^- крови [6]. Интерпретация результатов оценки лактата при проведении нагрузочного тестирования спортсменов, пациентов с ишемической болезнью сердца, хронической обструкцией дыхательных путей (ХОБЛ), хронической почечной недостаточностью часто затруднена, поскольку резкое повышение уровня La^- характеризует нормальную реакцию на физическую нагрузку. Это происходит в ситуации, если превышены скорость и мощность работы, при которой La^- может быть удален из крови так же быстро, как и поступил в нее из мышечной или других тканей. Повышение концентрации La^- обязательно свидетельствует об ишемии или гипоксемии. Так, в работе [7] показано, что при заражении эритроцитов малярийным паразитом *Plasmodium falciparum* скорость гликолиза эритроцитов увеличивается до 100 раз, приводя к ацидозу и влияя тем самым на сродство гемоглобина к кислороду. С другой стороны, практически нет данных, касающихся влияния процессов анаэробного гликолиза в эритроцитах на работоспособность пациента или спортсмена, поэтому уточнение механизмов изменений концентрации La^- как в плазме, так и в цельной крови является актуальным.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить роль лактата эритроцитов в адаптации к физической нагрузке при тестировании на велоэргометре.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестирование общей физической работоспособности спортсменов ($n=69$) национальных команд проводилось при выполнении велоэргометрической нагрузки до отказа со ступенчатым повышением ее мощности каждую минуту с 75 Вт при скорости педалирования 60–65 об/мин. Определение аэробного и анаэробного порогов и деление контингента спортсменов на группы производились согласно рекомендациям [5]. Первая группа (Гр.) спортсменов характеризовалась низкой мощностью выполняемой работы на уровне аэробного и анаэробного порогов, а вторая – высокой. Так, для 1-й группы (26 спортсменов) и 2-й (43 спортсмена) мощность выполняемой работы, соответствующей анаэробному порогу, составляла менее и более 300 Вт соответственно.

Взятие капиллярной крови из дистальной фаланги пальца для определения лактата крови производилось гепаринизированными капиллярами на каждой ступени

нагрузочного тестирования, а также на третьей и восьмой минутах восстановления после проведения тестирования. На проведение процедуры забора капиллярной крови получалось информированное согласие. Получение эквивалентного объема эритроцитарной массы (20 мкл) для анализа в ней La^- производилось после центрифугирования (400 g) в течение 5 мин. Концентрация лактата в капиллярной крови и эритроцитах измерялась электрохимическим методом с использованием анализатора лактата Biosen (Германия). Оценка содержания эритроцитов, других морфологических элементов крови и средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС-О) до и после выполнения нагрузки производилась при помощи гематологического автоанализатора Sysmex-XN 350 (Япония).

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения JASP, версия 0.18.3.0 (GNU Affero GPL, лицензия), для проверки нулевой гипотезы применяли однофакторный дисперсионный анализ, непараметрический анализ (U-критерий Mann – Whitney) и ранговый тест Уилкоксона с оценкой апостериорной вероятности на основе теоремы Байеса [8]. При этом использовался коэффициент Байеса BF_{10} для количественной оценки доказательств альтернативной гипотезы относительно нулевой гипотезы. Преимуществом применения теоремы Байеса является рост вероятности правильности выдвигаемой гипотезы по мере увеличения объема накопленных данных [8].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Значения концентрации лактата, а также другие характеристики компонентов крови до и после тестирования представлены в табл. 1. Статистический анализ показал, что до тестирования различия в содержании La^- между группами отсутствовали (табл. 2), у спортсменов обеих групп наблюдался рост концентрации лактата капиллярной крови: значение (La^-) цельной крови в первой группе на пике нагрузки составляло $9,55 \pm 1,50$, во второй – $8,82 \pm 3,01$ ммоль/л, $p > 0,05$.

Содержание La^- в эритроцитах до тестирования было ниже, чем в цельной крови, а после нагрузки повышалось, но не достигало величин, характерных для цельной крови.

Выполнение нагрузки до отказа сопровождалось ростом частоты сердечных сокращений. Наиболее выраженный прирост выявлен в первой группе – $183,40 \pm 5,08$ уд/мин. Спортсмены второй группы, несмотря на большую мощность выполняемой нагрузки (более 450 Вт), характеризовались меньшей максимальной частотой сердечных сокращений, которая не превышала 175 уд/мин.

Таблица 1
Показатели концентрации лактата в цельной крови и эритроцитах до и после проведения нагрузочного тестирования

Table 1
Lactate levels in whole blood and red blood cells before and after load testing

Показатели	До тестирования				После тестирования			
	Цельная кровь, ммоль/л		Эритроциты, ммоль/л		Цельная кровь, ммоль/л		Эритроциты, ммоль/л	
	Гр. 1	Гр. 2	Гр. 1	Гр. 2	Гр. 1	Гр. 2	Гр. 1	Гр. 2
Среднее	2,07	2,15	1,28	1,21	9,55	8,82	6,88	5,15
σ	0,70	0,71	0,42	0,48	1,50	3,01	1,79	1,56
Мин.	0,89	0,84	0,70	0,60	6,44	5,80	4,17	3,71
Макс.	3,65	4,04	2,16	2,88	11,81	15,79	9,43	8,01



Таблица 2

Сравнительный анализ показателей концентрации лактата (ммоль/л) у пациентов групп наблюдения при проведении нагрузочного тестирования (U-критерий Mann – Whitney)
Table 2

Comparative analysis of lactate levels (mmol/L) in patients of the observation groups during load testing (Mann – Whitney U Test)

Параметр	Значение U-статистики	p	Размер эффекта
Исходное значение лактата цельной крови	378,50	0,670	–0,07
Лактат цельной крови на уровне аэробного порога	61,00	< ,001	–0,85
Лактат цельной крови на уровне анаэробного порога	58,00	< ,001	–0,85
Лактат цельной крови на заключительной ступени нагрузки	461,50	0,436	0,13
Исходное значение лактата эритроцитов	465,50	0,402	0,14
Лактат эритроцитов заключительной ступени нагрузки	603,50	0,004	0,47

Проведенный анализ групп наблюдения выявил статистически значимые различия в анализируемых показателях у спортсменов сопоставляемых групп (табл. 2). В частности, достоверные различия между группами определены в показателях концентрации лактата на уровне аэробного и анаэробного порогов, а также в содержании лактата в эритроцитах.

Известно, что фактор Байеса (BF) является оценкой доказательности нулевой гипотезы (H_0), при этом значения фактора Байеса указывают на соотношение априорных и апостериорных шансов. Проведение дисперсионного анализа и расчета BF показало, что для показателя «лактат цельной крови» коэффициент Байеса (BF_{10}) был равен 0,407, что доказывает отсутствие различий. И наоборот, коэффициент Байеса при оценке межгрупповых различий La^- эритроцитов был равен 64,58. Это свидетельствует о том, что альтернативная гипотеза о наличии различий между группами в 64 раза более вероятна, чем нулевая гипотеза.

Таким образом, применение фактора Байеса позволило доказать эффект влияния нагрузочного тестирования на внутриэритроцитарное содержание лактата. Коэффициент Байеса, равный $BF_{10}=1$, указывает на то, что данные в равной степени соответствуют альтернативной гипотезе и нулевой гипотезе.

Ранее в исследовании [9] установлено, что распределение лактата между плазмой и эритроцитами подчиняется уравнению Доннана и что концентрация La^- пропорционально реагирует на изменение парциального давления углекислого газа и кислорода – pCO_2 и pO_2 . В работе [3] показано, что у спортсменов при концентрации лактата крови 1,6 ммоль/л скорость его поступления в кровяное русло выше по сравнению с таковой у нетренированных добровольцев. Суммарное поступление La^- значительно выше ($p<0,05$) в эритроцитах спринтеров по сравнению с таковым в эритроцитах нетренированных испытуемых.

Таким образом, на заключительном этапе исследования была проведена проверка гипотезы, согласно которой концентрация La^- в красных кровяных тельцах (эритроцитах), влияющая на работоспособность спортсменов второй группы, приводит к изменению структурно-функциональных характеристик эритроцитов.

Проведение нагрузочного тестирования (продолжительность не более 30 мин) сопровождалось снижением оптического параметра средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC-O) на 4% ($p<0,05$), ростом уровня гемоглобина

и гематокрита на 7% ($p<0,05$), тенденцией к росту анизоцитоза. Проверка апостериорной вероятности выявила (табл. 3), что высокая работоспособность при проведении нагрузочного тестирования была связана с относительным эритроцитозом, более высоким уровнем гемоглобина, показателем гематокрита, средним объемом эритроцита (MCV) и низкой концентрацией гемоглобина в эритроците (MCHC-O). Эти результаты показывают, что реакция эритрона на нагрузку является изменяемым фактором, влияющим на устойчивость к утомлению и обеспечивающим лучшую работоспособность.

Поскольку показатели красной крови являются зависимыми друг от друга, то параллельный рост гемоглобина, гематокрита и среднего объема эритроцитов является прогнозируемым, при этом снижение MCHC-O (MCHC, измеренный расчетным способом, не изменялся) может быть связано с изменением дифрактометрических характеристик и/или как с гидратацией красных кровяных телец [10], так и с выходом эритроцитов из депо.

Если рост гематокрита происходит за счет пополнения клеточной популяции, то из селезенки, печени и мышц выходят преимущественно зрелые эритроциты, имеющие такие структурно-функциональные характеристики, которые обеспечивают адаптацию к физической нагрузке. При выполнении физических нагрузок лактат образуется в скелетных мышцах (преимущественно в белых гликолитических волокнах), и для поддержания его концентрации в клетках лактат и протоны транспортируются в кровь, что, вероятно, позволяет спортсмену дольше выполнять работу.

Вероятно, эритроциты могут не только выделять, но и поглощать La^- , создавая градиент для улучшения его транспорта из работающих мышц. Недиссоциированная молочная кислота может диффундировать через клеточные мембраны, а транспорт La^- через мембрану эритроцитов происходит с участием монокарбоксилатного транспортера (MCT), который переносит лактат-анион и протон, а также анионообменника, представленного белком полосы 3. Показано [4], что эритроциты различаются как по общей лактаттранспортной активности, так и по способности различных лактаттранспортных механизмов, причем общая лактаттранспортная активность обеспечивается в основном MCT. Если лактаттранспортная активность была низкой, то наряду с низкой активностью монокарбоксилатного транспортера роль основного переносчика лактата играет белок полосы 3 и неонная диффузия.

Таблица 3
Проверка апостериорной вероятности влияния нагрузки на эритроцитарные показатели (ранговый тест Уилкоксона)

Table 3
Verification of the posterior probability of the load impact on red blood cell counts (Wilcoxon Rank Test)

Показатели	BF_{10}
RBC	124,21
Hb	60,29
MCV	70,28
MCHC-O	27,92
Ht	26,33



Таким образом, поскольку различие в содержании лактата в эритроцитах выявлено только после выполнения физической нагрузки, для которой характерно снижение рН крови [11], то снижение скорости транспорта La^- в эритроцит или/и снижение гликолиза непосредственно в самих красных кровяных тельцах может обеспечивать лучшую работоспособность в условиях, при которых энергообеспечение реализовано преимущественно за счет анаэробного гликолиза. Подтверждением этого предположения являются исследования [12], в которых было показано, что после тренировки более чем на 90% было повышено содержание белка МСТ-1 в эритроцитах. Полученные результаты свидетельствуют о снижении транспорта лактата в эритроциты во время тренировки и его росте в период восстановления.

При проведении общего анализа крови выявлены изменения и в показателях лейкоцитарной формулы. В частности, после выполнения нагрузочного тестирования абсолютное количество нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов увеличилось на 57, 26 и 108% ($p < 0,05$) соответственно. Появления аномальных клеток, или «флагов», при автоматизированном гематологическом исследовании не зафиксировано.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе выполнения тестирующей нагрузки у подавляющего большинства наблюдаемых спортсменов выявляются изменения, которые зависят от квалификации спортсменов и периода их подготовки. К настоящему времени врачи спортивной медицины и тренеры связывают способность спортсменов высокой квалификации выполнять работу большого объема и интенсивности на фоне высокой концентрации лактата крови после тестирующей нагрузки в зоне субмаксимальной мощности с резистентностью организма к росту внутриклеточного лактата и снижению рН крови. Известно [4], что образовавшийся лактат удаляется путем окисления в волокнах I типа или повторно синтезируется в гликоген в волокнах IIb типа или в глюкозу печени. Первый переносчик лактата – монокарбоксилатный переносчик 1 (МСТ-1) тесно связан с транспортом лактата из гликолитических белых мышечных волокон в красные окислительные мышечные волокна, тогда как монокарбоксилатный переносчик 4 (МСТ-4) связан с переносом лактата за пределы клетки.

Быстросокращающиеся гликолитические белые мышцы, такие как белая икроножная мышца, экспрессируют МСТ-4, но при этом экспрессия МСТ-1 оказывается низкой. Медленно сокращающаяся окислительная мышца (камбаловидная), наоборот, экспрессирует небольшое количество МСТ-4 и значительное МСТ-1. Кроме того, МСТ-1 важен для выведения лактата из кровотока.

Таким образом, концентрация лактата крови при проведении тестирования является результатом его образования и последующих процессов биотрансформации. Оценка внутриэритроцитарной концентрации лактата при проведении нагрузочного тестирования показала, что снижение скорости транспорта лактата в эритроцит или/и снижение гликолиза непосредственно в самих красных кровяных тельцах могут обеспечивать лучшую работоспособность в условиях, когда энергообеспечение реализовано преимущественно за счет анаэробного гликолиза. Полученные результаты могут свидетельствовать о снижении транспорта лактата в эритроциты во время тренировки и его росте в период восстановления.

Проведенный анализ влияния физической нагрузки на показатели эритрона с использованием рангового теста Уилкоксона показал, что все показатели, кроме

МСНС-О (средняя концентрация гемоглобина в эритроците), повышались. Проверка апостериорной вероятности выявила, что высокая работоспособность при проведении нагрузочного тестирования была связана с относительным эритроцитозом, более высоким уровнем гемоглобина, гематокритом, средним объемом эритроцита и низкой концентрацией гемоглобина в эритроците. Эти результаты могут свидетельствовать о том, что реакция эритронов на нагрузку является изменяемым фактором, влияющим на устойчивость к утомлению и обеспечивающим лучшую работоспособность. Выявлен рост абсолютного количества нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов после выполнения нагрузочного тестирования.

Величина гематокрита при проведении комплексных осмотров во время этапного научного контроля у спортсменов, по данным лаборатории биохимии РНПЦ спорта, имеет высокую вариабельность: встречаются спортсмены как с высокими, так и с низкими значениями (по сравнению с референтными, характерными для представителей этого возраста и пола). Общеизвестно, что высокий уровень Ht может приводить к росту вязкости крови, увеличивая нагрузку на сердце, обладая способностью вызывать его перегрузку. Увеличение гематокрита при физической нагрузке возможно из-за снижения объема плазмы, когда происходит потеря жидкости из-за потоотделения, перераспределение жидкой части плазмы и ее выход во внеклеточное пространство, поскольку там происходит накопление осмотически активных метаболитов. В итоге увеличивается коллоидно-осмотическое давление, что способно привести к замедлению оттока жидкости.

В работе [13] сообщается, что объем плазмы и объем крови быстро увеличивались после тренировок, в то время как гематокрит не менялся в течение нескольких суток, прежде чем он начал увеличиваться [14]. Величина изменения Ht, по-видимому, зависит от интенсивности упражнений во время тренировок и типа упражнений. Многолетние исследования, проводимые в лаборатории биохимии РНПЦ спорта, выявили колебания Ht в течение спортивного сезона с более низкими значениями в начале спортивного сезона. Эти изменения зависят от характера спортивной подготовки и использования учебно-тренировочных сборов в условиях среднегорья.

У спортсменов, находящихся под наблюдением в РНПЦ спорта, встречаются случаи «спортивной анемии», которые можно объяснить, например, гемолизом, который вызывается напряжением сдвига, происходящим во время выполнения физической нагрузки, превышающим физиологические значения в состоянии покоя. Особенно часто это может происходить у бегунов, у пловцов, а также во время бега по пересеченной местности, особенно в условиях средне- и высокогорья.

Было показано, что физическая нагрузка влияет на состояние мембраны эритроцитов, что коррелирует с повышенным уровнем гаптоглобина [15]. При этом стареющие эритроциты могут быть особенно склонны к внутрисосудистому гемолизу, вызванному физической нагрузкой, о чем свидетельствует снижение средней плотности плавучести эритроцитов и кривая распределения плотности, которая была смещена в сторону более молодых, менее плотных клеток у тренированных индивидуумов, на что указывают повышенный уровень активности пируваткиназы, 2,3-дифосфоглицерата и показатель P_{50} , более высокое количество ретикулоцитов [16]. Другими возможными причинами «спортивной анемии» могут быть измененный состав липидов эритроцитарной мембраны и различия в показателе «общий объем



гемоглобина» (tHb) [17], который лучше отражает кислородную емкость крови и ее способность к транспорту O_2 . Показатель tHb получил широкое распространение в спортивной медицине и физиологии, поскольку различные по воздействию тренировки могут приводить к изменению tHb, особенно в условиях измененного состава газовой среды. Проведенные нами исследования позволяют косвенно оценивать изменения тотального гемоглобина у спортсменов, основанные на приросте уровня гемоглобина и гематокрита в ответ на физическую нагрузку в сочетании со снижением МСНС. При этом результаты удовлетворительно согласуются с данными о повышении работоспособности и максимального потребления кислорода, значение которого оказалось выше у тренированных спортсменов [17]. Установлено [18], что высокий уровень тотального гемоглобина характерен и для аборигенов высокогорных районов, объем крови которых был повышен с 80 до 100 мл/кг.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ динамики изменения уровня лактата цельной крови и эритроцитов спортсменов при выполнении ими нагрузочного тестирования. Установлено, что рост мощности выполняемой нагрузки обеспечивается за счет активации гликолитической системы энергообеспечения, при этом в красных кровяных тельцах доминируют внутриэритроцитарные процессы поддержания гомеостазиса. Показано, что эритроциты принимают участие в адаптации спортсменов к гипоксии при нагрузке. Снижение скорости транспорта лактата в эритроцит или/и снижение гликолиза в красных кровяных тельцах может обеспечивать лучшую работоспособность в условиях, при которых энергообеспечение реализовано преимущественно за счет анаэробного гликолиза. Высокая работоспособность спортсменов при проведении нагрузочного тестирования была ассоциирована с эритроцитозом, более высоким уровнем гемоглобина, гематокрита, средним объемом эритроцита и низкой концентрацией гемоглобина в эритроците.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Poole R, Halestrap A. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993;264:C761–82. doi: 10.1152/ajpcell.1993.264.4.c761
2. Goodwin M, Harris J, Hernández A, Gladden L. Blood Lactate Measurements and Analysis during Exercise: A Guide for Clinicians. *J Diabetes Sci Technol*. 2007;1:558–69. doi: 10.1177/193229680700100414
3. Skelton M, Kremer D, Smith E, Gladden L. Lactate influx into red blood cells from trained and untrained human subjects. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30:536–42. doi: 10.1097/00005768-199804000-00011
4. Smith J, Telford R, Kolbuch-Braddon M, Weidemann M. Lactate/H⁺ uptake by red blood cells during exercise alters their physical properties. *European Journal of Applied Physiology*. 1996;75:54–61. doi: 10.1007/s004210050126
5. Svedahl K, MacIntosh B. Anaerobic Threshold: The Concept and Methods of Measurement. *Can J Appl Physiol*. 2003;28:299–323. doi: 10.1139/h03-023
6. Van Hall G, Jensen-Ustad M, Rosdahl H, Holmberg H-C, Saltin B, Calbet J a. L. Leg and arm lactate and substrate kinetics during exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2003;284:E193–205. doi: 10.1152/ajpendo.00273.2002
7. Oyelade J, Isewon I, Rotimi S, Okunoren I. Modeling of the Glycolysis Pathway in *Plasmodium falciparum* using Petri Nets. *Bioinform Biol Insights*. 2016;10:49–57. doi: 10.4137/BBI.537296
8. Van Doorn J, Marsman M, Wagenmakers E-J. Bayesian rank-based hypothesis testing for the rank sum test, the signed rank test, and Spearman's ρ . *Journal of Applied Statistics*. 2020;47:2984–3006. doi: 10.1080/02664763.2019.1709053
9. Wahl P, Yue Z, Zinner C, Bloch W, Mester J. A mathematical model for lactate transport to red blood cells. *J Physiol Sci*. 2011;61:93–102. doi: 10.1007/s12576-010-0125-8
10. Mohandas N, Kim Y, Tycko D, Orlik J, Wyatt J, Groner W. Accurate and Independent Measurement of Volume and Hemoglobin Concentration of Individual Red Cells by Laser Light Scattering. *Blood*. 1986;68:506–13. doi: 10.1182/blood.V68.2.506.506
11. Robergs R, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287:R502–516. doi: 10.1152/ajpregu.00114.2004

12. Opitz D, Lenzen E, Opiolka A, Redmann M, Hellmich M, Bloch W. Endurance training alters basal erythrocyte MCT-1 contents and affects the lactate distribution between plasma and red blood cells in T2DM men following maximal exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93:413–9. doi: 10.1139/cjpp-2014-0467
13. Thirup P. Haematocrit: Within-Subject and Seasonal Variation. *Sports Medicine*. 2003;33:231–43. doi: 10.2165/00007256-200333030-00005
14. Sawka M, Convertino V, Eichner E, Schnieder S, Young A. Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2000;32:332. doi: 10.1097/00005768-200002000-00012
15. Jordan J, Kiernan W, Merker H, Wenzel M, Beneke R. Red Cell Membrane Skeletal Changes in Marathon Runners. *Int J Sports Med*. 1998;19:16–9. doi: 10.1055/s-2007-971873
16. Mairbaurl H, Humpeler E, Schwabberger G, Pessenhofer H. Training-dependent changes of red cell density and erythrocytic oxygen transport. *Journal of Applied Physiology*. 1983;55:1403–7. doi: 10.1152/jap.1983.55.5.1403
17. Schmidt W, Prommer N. Effects of various training modalities on blood volume. *Scandinavian Med Sci Sports*. 2008;18:57–69. doi: 10.1111/j.1600-0838.2008.00833.x.
18. Sánchez C, Merino C, Figallo M. Simultaneous measurement of plasma volume and cell mass in polycythemia of high altitude. *Journal of Applied Physiology*. 1970;28:775–8. doi: 10.1152/jap.1970.28.6.775



<https://doi.org/10.34883/PL.2025.14.4.010>



Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Пашкевич А.М., Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г.,
Короткевич П.Е., Субоч Е.И.✉, Портянко А.С.

Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской
радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Возможности мониторинга уровня циркулирующей опухолевой ДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого с использованием маркера метилирования RASSF1

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Смирнов С.Ю. – концепция исследования, анализ полученных данных, редактирование; Медведь А.В., Пашкевич А.М. – анализ полученных данных, интерпретация данных; Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е. – сбор и обработка биоматериала, подготовка текста к печати; Субоч Е.И., Портянко А.С. – обработка, редактирование, подготовка текста к печати.

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) в рамках договора № M23РНФ-131. Финансовой поддержки со стороны компаний – производителей использованных в исследовании материалов и медицинского оборудования авторы не получали.

Подана: 28.07.2025

Принята: 12.11.2025

Контакты: helen_suboch@mail.ru

Резюме

Введение. Несмотря на активное изучение возможностей жидкостной биопсии для оценки молекулярно-генетического профиля опухоли и мониторинга эффективности проводимого лечения у пациентов с немелкоклеточным раком легкого, большинство научных работ затрагивает только одну гистологическую форму данного заболевания – аденокарциному. Одной из причин, обуславливающих данную особенность, является значительная гетерогенность генетических нарушений при плоскоклеточном раке легкого. Так, согласно данным The Cancer Genome Atlas, при данной гистологической форме наиболее часто патогенные варианты обнаруживаются в генах TP53 (80%), MUC16 (48%) и CSMD3 (47%). Однако, в отличие от аденокарциномы, при данной форме заболевания отсутствуют так называемые хот-споты в указанных генах – участки с высокой частотой встречаемости генетических нарушений. Так, например, частота встречаемости самого распространенного патогенного варианта в гене TP53 R158L при плоскоклеточном раке легкого не превышает 3%. В связи с этим актуальным направлением исследований у пациентов с данной формой заболевания является поиск и дальнейшее использование в качестве молекулярных мишеней циркулирующей опухолевой ДНК (цОДНК) различных эпигенетических нарушений.

Цель. Изучить возможность использования эпигенетических нарушений в гене RASSF1 в качестве мишени цОДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили опухолевая ткань (FFPE; n=9) и серийные образцы плазмы крови (n=20) пациентов с 3–4-й ст. плоскоклеточного рака легкого, проходивших лечение на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова в период с 2023 по 2025 г. Всем пациентам проведено локальное облучение

опухолевого очага в дозе 4 Гр. Оценку статуса метилирования промоторной области гена RASSF1 в опухолевой ткани проводили с использованием метил-специфичной ПЦР с детекцией результатов в 3%-ном агарозном геле. Качественную и количественную оценку цоДНК проводили с использованием системы цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) QX600+AutoDG (Bio-Rad, США).

Результаты. В ходе исследования подтверждена высокая частота встречаемости метилирования промоторной области гена RASSF1 при плоскоклеточном гистологическом варианте рака легкого (72%). Несмотря на значительное снижение концентрации ДНК после бисульфитной конверсии, показана возможность использования эпигенетических нарушений в качестве опухоль-специфичных маркеров цоДНК.

Заключение. Метилирование промоторной области гена RASSF1 может являться одним из перспективных маркеров цоДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак легкого, жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, метилирование, RASSF1

Smirnou S., Miadzvedz A., Pashkevich A., Pivavarchyk S., Vakhomchyk T., Karatkevich P., Subach H.✉, Portyanko A.

N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus

Opportunities of Monitoring Circulating Tumor DNA Levels in Patients with Squamous Cell Lung Cancer Using the RASSF1 Methylation Marker

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Smirnou S. – research concept, data analysis, editing; Miadzvedz A., Pashkevich A. – data analysis, data interpretation; Pivavarchyk S., Vakhomchyk T., Karatkevich P. – biological material collection and processing, manuscript preparation for printing; Subach E., Portyanko A. – processing, editing, manuscript preparation for printing.

Funding. The study was carried out with the support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research within the framework of the agreement No. M23RSF–131. The authors did not receive financial support from companies manufacturers of materials and medical equipment used in the study.

Submitted: 28.07.2025

Accepted: 12.11.2025

Contacts: helen_suboch@mail.ru

Abstract

Introduction. Despite active exploring opportunities of "liquid biopsy" for assessing molecular genetic profile of tumors and treatment efficiency monitoring in patients with non-small cell lung cancer, most studies focus on a single histological form of this disease: adenocarcinoma. One of the reasons for this is the significant genetic heterogeneity observed in squamous cell lung cancer. According to data from The Cancer Genome Atlas, pathogenic variants are most frequently found in the TP53 (80%), MUC16 (48%), and CSMD3 (47%) genes in this histological form. However, unlike adenocarcinoma, this form of the disease lacks so-called "hot spots" in these genes, i.e., regions with a high frequency of genetic abnormalities. For example, the frequency of the most common pathogenic variant in the TP53 gene R158L doesn't exceed 3% in squamous cell lung carcinoma.

Therefore, a relevant area of research in patients with this form of the disease is searching for and further use of various epigenetic alterations as molecular targets in circulating tumor DNA (ctDNA).

Purpose. To investigate the feasibility of using epigenetic alterations in the RASSF1 gene as a target for ctDNA in patients with squamous cell lung cancer.

Materials and methods. The study used tumor tissue samples (FFPE; n=9) and serial plasma samples (n=20) from patients with stage 3–4 squamous cell lung cancer who were treated at the N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus between 2023 and 2025. All patients received local radiation therapy to the tumor site at a dose of 4 Gy. Methylation status of the RASSF1 gene promoter region in tumor tissue was assessed using methylation-specific PCR with results detected in a 3% agarose gel. The qualitative and quantitative ctDNA evaluation was performed using the QX600+AutoDG digital droplet PCR system (Bio-Rad, USA).

Results. The study confirmed a high frequency (72%) of methylation of the RASSF1 promoter region in the squamous cell histological variant of lung cancer. Despite a significant reduction in DNA concentration after bisulfite conversion, the feasibility of using epigenetic alterations as tumor-specific markers in ctDNA was demonstrated.

Conclusion. The methylation of the RASSF1 gene promoter region may serve as a promising marker for ctDNA in patients with squamous cell lung cancer.

Keywords: squamous cell lung cancer, liquid biopsy, circulating tumor DNA, methylation, RASSF1

■ ВВЕДЕНИЕ

Плоскоклеточный рак легкого является второй по частоте встречаемости гистологической формой немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), на долю которого приходится около 20% всех случаев данного заболевания (около 440 000 новых случаев в мире за 2020 год) [1].

Отсутствие таргетной терапии и гетерогенность молекулярно-генетического профиля опухоли значительно снижают интерес научного сообщества к плоскоклеточному раку легкого, в сравнении с аденокарциномой, в области изучения циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК).

Стоит отметить, что, согласно данным литературы, динамика концентрации цоДНК может быть успешно использована для оценки эффективности не только таргетных препаратов, но и классических схем химиотерапии [2, 3]. Так, в работе Tie J. и соавт., изучавших динамику цоДНК у пациентов с колоректальным раком, получавших стандартную терапию по схемам FOLFOX или FOLFIRI, показана корреляция уровня цоДНК с ответом на лечение, характеризующаяся увеличением показателей выживаемости без прогрессирования у пациентов со значительным снижением уровня цоДНК в плазме крови [4]. В свою очередь, количественное повышение цоДНК на фоне терапии может свидетельствовать о развитии резистентности опухоли к проводимому лечению. Данное событие может регистрироваться за несколько месяцев до фиксации прогрессирования заболевания радиологическими методами [5, 6].

В связи с наличием нескольких схем классической химиотерапии плоскоклеточного рака легких, включающих препараты платины, гемцитабин и паклитаксел,

своевременная детекция характера ответа опухоли на проводимое лечение может значительно повысить показатели выживаемости пациентов с данной формой заболевания.

Значительная генетическая гетерогенность плоскоклеточного рака легкого, а именно отсутствие так называемых горячих точек в ключевых генах канцерогенеза данной формы заболевания, усложняет подходы к исследованию цоДНК. Так, согласно данным The Cancer Genome Atlas, при плоскоклеточном раке наиболее часто патогенные варианты обнаруживаются в генах TP53 (80%), MUC16 (48%) и CSMD3 (47%), но при этом частота встречаемости самого распространенного патогенного варианта в гене TP53 R158L не превышает 3% [7]. Для получения достоверных данных о цоДНК в таком случае необходимо использование дорогостоящей и трудоемкой технологии секвенирования нового поколения, позволяющей изучать широкий спектр генетических нарушений и в последующем разрабатывать на основе полученных результатов персонализированные тест-системы для цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) [8].

Однако для НМРЛ, в том числе и плоскоклеточного гистологического варианта заболевания, характерно наличие опухоль-специфических эпигенетических нарушений. Одним из них является метилирование промоторной области гена RASSF1, кодирующего белок, участвующий в регуляции клеточного цикла, апоптоза и процессов адгезии клеток [9]. Данная эпигенетическая абберация не встречается в нормальной ткани легкого, но выявляется примерно в 30% случаев аденокарциномы и 40% случаев плоскоклеточного рака легкого (TCGA), а согласно результатам некоторых исследований, возможно, и в большем проценте случаев [7, 10, 11]. Таким образом, использование маркера метилирования RASSF1 в качестве мишени может быть эффективной стратегией детекции цоДНК при плоскоклеточном раке легкого. Основными трудностями на этапе исследования могут являться: низкая концентрация цоДНК в плазме крови и наличие дополнительного этапа пробоподготовки (бисульфитная конверсия).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить возможность использования метилирования промоторной области гена RASSF1 в качестве мишени для исследования цоДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужил биологический материал (опухолевая ткань, в том числе полученная при проведении бронхоскопии, n=9 и плазма крови, n=20) пациентов с плоскоклеточным раком легкого 3–4-й ст., проходивших специальное лечение на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александро́ва в 2023–2025 гг. В рамках научно-исследовательской работы БРФФИ-РНФ № 131 всем пациентам было проведено локальное облучение опухолевого очага в дозе 4 Гр с целью индукции выброса цоДНК в кровоток. Для оценки уровня цоДНК венозной крови была забрана в следующие временные промежутки: до облучения, через 6, 12, 24 и 48 часов после его окончания.

Выделение ДНК из образцов опухолевой ткани (FFPE), а также цоДНК из образцов плазмы крови проводили с помощью наборов реагентов QIAamp DNA FFPE kit



Таблица 1
Последовательность праймеров и зондов для цкПЦР
Table 1
Sequence of primers and probes for ddPCR

№	Праймер	Последовательность 5–3
1	F-met	TTTGTATTTAGGTTTTATTGCGC
2	R-met	CCGACTTCGCTAACTTTAAACG
3	F-unmet	ATTTAGGTTTTATTGTGTGG
4	R-unmet	CCATACTCACTAACTTTAAACACT

(Qiagen, Германия) и MagListo cfDNA kit (Bioneer, Южная Корея) соответственно, согласно инструкциям производителей. Оценку количества выделенной ДНК проводили спектрофлуориметрически, а степень очистки (за исключением цоДНК) исследовали с помощью спектрофотометра.

Бисульфитную конверсию проводили с использованием набора реагентов EpiJel Bisulfite conversion kit (ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя, с максимально возможным объемом исследуемой ДНК.

Постановку метил-специфичной ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов ChemTaq полимеразы с буферами («АртБиоТех», Беларусь) и кастомных олигонуклеотидных праймеров, дизайн которых был осуществлен в рамках НИР БРФФИ-РНФ № 131 (табл. 1).

Детекцию целевых продуктов проводили с помощью гель-электрофореза (3% агароза).

Постановку цкПЦР осуществляли на оборудовании QX600+AutoDG (Bio-Rad, США) с применением мастер-микса производителя EvaGreen (Bio-Rad, США). Реакции для детекции цоДНК ставили в дублях, среднее количество капель при анализе одного образца составило 40 000. Пороговый уровень для детекции генетических нарушений во всех случаях составил >3 положительных сигналов.

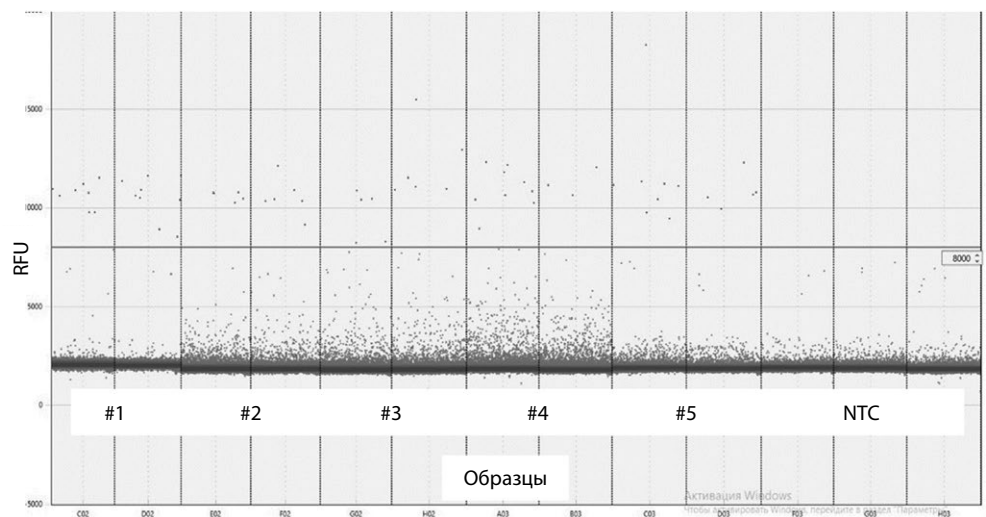
Условия постановки ПЦР могут быть предоставлены по запросу.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК выделена из всех образцов опухолевой ткани, средняя концентрация составила 5 мкг/л. После бисульфитной конверсии наблюдалось снижение концентрации ДНК на 90%, в среднем до 0,5 мкг/л. Полученные данные соответствуют описанным в литературе [12]. Метилирование промоторной области гена RASSF1 детектировано в 7 из 9 случаев (77,8%).

ЦоДНК выделена из всех образцов плазмы крови, средняя концентрация составила 0,35 мкг/л. Спектрофлуориметрические показатели концентрации цоДНК после бисульфитной конверсии находились вне диапазона доступных для измерения значений. Метилирование промоторной области гена RASSF1 минимум в один временной промежуток обнаружено у всех 4 пациентов. Пример результатов цкПЦР представлен на рисунке.

Результаты выполненного исследования позволяют полагать, что концентрация цоДНК у пациентов с плоскоклеточным раком легкого варьирует в различные временные промежутки. Вероятность детекции цоДНК у пациентов без дополнительных вмешательств составила 50%. Наибольшая вероятность обнаружения цоДНК



Результаты цкПЦР серийных образцов плазмы (#1–5) от одного пациента с наличием метилирования промотора гена RASSF1 в опухолевой ткани (дубли) и отрицательного контроля (NTC; вода; триплет)
Results of the ddPCR series of plasma samples (#1–5) from a single patient, showing the presence of methylation of the RASSF1 gene promoter in tumor tissue (duplicates) and a negative control (NTC; water; triplet)

Таблица 2
Концентрации цоДНК в серийных образцах плазмы
Table 2
ctDNA concentration in series of plasma samples

	pts.1	pts.2	pts.3	pts.4
#1	0,42	0	0	0,24
#2	0,27	0,06	0,05	0,92
#3	0	0	0	0,54
#4	0,24	0,07	0	0,29
#5	0,22	0,04	0,03	0,16

соответствовала временным промежуткам спустя 6 и 48 часов после облучения. Снижение количества цоДНК спустя 12 часов после индукции ее выброса в кровоток может быть связано с гистологическими различиями плоскоклеточного рака легкого в сравнении с аденокарциномой. В ходе выполнения темы НИР БРФФИ-РНФ № 131 установлено, что медиана нормированной концентрации цоДНК в 3-ю точку забора при аденокарциноме (n=12) составила 0,18 копий/мкл, в то время как при плоскоклеточном раке легкого (n=4) – 0 копий/мкл. Показатели концентрации цоДНК в копиях/мкл (нормированные на 0,1 нг ДНК) в различные временные интервалы представлены в табл. 2.



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подтверждена высокая частота встречаемости метилирования промоторной области гена RASSF1 при плоскоклеточной форме рака легкого. Показана возможность использования эпигенетических нарушений в качестве опухоль-специфичных маркеров цодНК, однако для повышения информативности данных исследований представляется целесообразным увеличение объемов плазмы крови для выделения цодНК (4–8 мл) и применение ферментативных наборов реагентов для осуществления бисульфитной конверсии, сокращающих потери ДНК в процессе пробоподготовки.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Zhang Y., Vaccarella S., Morgan E. et al. Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study. *Lancet Oncol.* 2023;24(11):1206–1218. doi: 10.1016/S1470-2045(23)00444-8
2. Shibuku T., Bando H., Ueno M. *ctDNA Analysis Shows Promise for Treatment Monitoring in Advanced Pancreatic Cancer*. Gastrointestinal Cancer Symposium 2025. Available at: <https://meetings.asco.org/abstracts-presentations/241431>
3. Pellini B., Madison R., Childress M. et al. Circulating Tumor DNA Monitoring on Chemo-immunotherapy for Risk Stratification in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin cancer res.* 2023;29(22):4596–605. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-1578
4. Tie J., Kinde I., Wang Y. et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1715–1722. doi: 10.1093/annonc/mdv177
5. Clatot F., Perdrix A., Beaussire L. et al. Risk of early progression according to circulating ESR1 mutation, CA-15.3 and cfDNA increases under first-line anti-aromatase treatment in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22:56. doi: 10.1186/s13058-020-01290-x
6. Herbreteau G., Vallee A., Charpentier S. et al. Circulating free tumor DNA in non-small cell lung cancer (NSCLC): clinical application and future perspectives. *J. Thorac. Dis.* 2019;11:113–126. doi: 10.21037/jtd.2018.12.18
7. TCGA_LUSC project. Genomic Data Commons. 2025. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov>
8. Signatera. Natera. 2025. Available at: <https://www.natera.com/oncology/signatera-advanced-cancer-detection>
9. Dubois F., Bergot E., Zalcman G. et al. RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis – an updated review. *Cell Death Dis.* 2019;10:928. doi: 10.1038/s41419-019-2169-x
10. Li W., Deng J., Tang J. Combined Effects Methylation of FHIT, RASSF1A and RAR β Genes on Non-Small Cell Lung Cancer in the Chinese Population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(13):5233–5237. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.13.5233
11. Gao H., Yang J., He L. et al. The Diagnostic Potential of SHOX2 and RASSF1A DNA Methylation in Early Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol.* 2022;12. Available at: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.849024/full>. doi: 10.3389/fonc.2022.849024
12. Orntoft M.B., Jensen S., Hansen T. Comparative analysis of 12 different kits for bisulfite conversion of circulating cell-free DNA. *Epigenetics.* 2017;12(8):626–636. doi: 10.1080/15592294.2017.1334024



Липницкий А.Л.

Могилевская областная клиническая больница, Могилев, Беларусь
Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Сывороточное железо как потенциальный маркер наступления смерти мозга у пациентов с черепно-мозговой травмой

Конфликт интересов: не заявлен.

Подана: 13.05.2025

Принята: 10.10.2025

Контакты: lipnitski.al@gmail.com

Резюме

Введение. Уровень сывороточного железа является малоизученным острофазовым показателем у пациентов с тяжелым необратимым повреждением головного мозга.

Цель. Установить предсказательную ценность определения уровня сывороточного железа как потенциального маркера наступления смерти головного мозга у пациентов с черепно-мозговой травмой на этапе проводимой интенсивной терапии.

Материалы и методы. В проспективное нерандомизированное исследование было включено 107 пациентов с тяжелым травматическим повреждением головного мозга. Были сформированы 2 группы пациентов: первую из них ($n=56$) составили пациенты, выписанные из стационара; вторую группу ($n=51$) – пациенты, у которых была констатирована смерть головного мозга.

Результаты. Уровень сывороточного железа на 1-е и 2-е сутки не являлся прогностическим фактором в плане наступления смерти мозга: AUC 0,585 (SE 0,129; 95% CI 0,437–0,722; $p=0,5$) для 1-х суток и AUC 0,573 (SE 0,107; 95% CI 0,407–0,728; $p=0,5$) для 2-х суток. На 3-и сутки было отмечено статистически значимое отличие между группами пациентов по уровню сывороточного железа: 5,1 (3,3; 9,8) мкмоль/л в группе 1 и 3 (2; 4,1) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,002$) (AUC 0,767 (SE 0,0703; 95% CI 0,619–0,879; $p=0,0001$)). Точка отсечения уровня сывороточного железа $\leq 3,2$ мкмоль/л характеризовала диагностическую чувствительность 58% и диагностическую специфичность 77,3%. Для уровня железа на 5-е сутки AUC была 0,676 (SE 0,0802; 95% CI 0,529–0,801; $p=0,028$); на 7-е сутки – 0,716 (SE 0,0795; 95% CI 0,556–0,844; $p=0,0066$); на 10-е сутки – 0,775 (SE 0,0962; 95% CI 0,611–0,894; $p=0,0043$).

Заключение. Концентрация сывороточного железа у пациентов со смертью мозга была статистически значимо ниже на 3-и (3 (2; 4,1) мкмоль/л), 5-е (3,4 (2,4; 4,4) мкмоль/л), 7-е (3,2 (2,4; 4,7) мкмоль/л) и 10-е (2,4 (1,6; 4,2) мкмоль/л) сутки интенсивной терапии в сравнении с пациентами с благоприятным исходом черепно-мозговой травмы. Анализ уровня сывороточного железа позволяет судить о наступлении смерти мозга у пациентов с тяжелым травматическим повреждением головного мозга.

Ключевые слова: сывороточное железо, повреждение мозга, черепно-мозговая травма, смерть мозга, потенциальный донор



Lipnitski A.

Mogilev Regional Clinical Hospital, Mogilev, Belarus

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Serum Iron as a Marker of Brain Death in Patients with Traumatic Brain Injury

Conflict of interest: nothing to declare.

Submitted: 13.05.2025

Accepted: 10.10.2025

Contacts: lipnitski.al@gmail.com

Abstract

Introduction. Serum iron level is a poorly studied acute-phase indicator in patients with severe irreversible brain injury.

Purpose. To establish the predictive value for determining serum iron levels as a potential marker for brain death in patients with traumatic brain injury at the intensive care stage.

Materials and methods. A total of 107 patients with severe traumatic brain injury were included in the prospective non-randomized study. Two groups of patients were formed: group 1 (n=56) consisted of patients discharged from the hospital; group 2 (n=51) included patients declared brain dead.

Results. Serum iron levels on days 1 and 2 were not a prognostic factor in terms of brain death occurrence: AUC 0.585 (SE 0.129; 95% CI 0.437–0.722; p=0.5) for day 1 and AUC 0.573 (SE 0.107; 95% CI 0.407–0.728; p=0.5) for day 2. On day 3, a statistically significant difference was noted in the level of serum iron: 5.1 (3.3; 9.8) $\mu\text{mol/L}$ in group 1 and 3 (2; 4.1) $\mu\text{mol/L}$ in group 2 (p=0.002) (AUC 0.767 (SE 0.0703; 95% CI 0.619–0.879; p=0.0001)). The cut-off point of the serum iron level ≤ 3.2 $\mu\text{mol/L}$ had a sensitivity of 58% and a specificity of 77.3%. The iron level on day 5 was AUC 0.676 (SE 0.0802; 95% CI 0.529–0.801; p=0.028); on day 7 it was 0.716 (SE 0.0795; 95% CI 0.556–0.844; p=0.0066); and on day 10 it was 0.775 (SE 0.0962; 95% CI 0.611–0.894; p=0.0043).

Conclusion. Serum iron levels in patients with brain death were statistically significantly lower on days 3 (3 (2; 4.1) $\mu\text{mol/L}$), 5 (3.4 (2.4; 4.4) $\mu\text{mol/L}$), 7 (3.2 (2.4; 4.7) $\mu\text{mol/L}$), and 10 (2.4 (1.6; 4.2) $\mu\text{mol/L}$) of intensive care compared to patients with a favorable outcome of traumatic brain injury. The analysis of serum iron levels allows making conclusions about brain death onset in patients with severe traumatic brain injury.

Keywords: serum iron, brain damage, traumatic brain injury, brain death, potential donor

■ ВВЕДЕНИЕ

Железо является одним из ключевых микроэлементов организма и играет критическую роль как в транспортировке кислорода, так и в синтезе большого числа ферментов и в клеточном метаболизме [1]. Основное внимание в исследованиях, посвященных изучению динамики сывороточного железа при отдельных формах патологии, уделяется пациентам с кровопотерей после различных хирургических вмешательств [2, 3]. Изменение концентрации сывороточного железа у пациентов,

находящихся в критическом состоянии, изучалось в ограниченном числе научных исследований [4]. Имеется ряд работ, в которых анализировалась динамика сывороточного железа у пациентов с черепно-мозговой травмой [5, 6]. В данных исследованиях было продемонстрировано быстрое снижение сывороточного железа у пациентов после травматического повреждения мозга, что может использоваться как предиктор возможного летального исхода [6].

У пациентов с тяжелым травматическим повреждением мозга в случае быстро и значительного нарастания отека и внутричерепного давления может происходить остановка кровообращения в головном мозге. В результате этого у данных пациентов констатируется смерть мозга (СМ), проводится консилиум по признанию их умершими, несмотря на наличие сердцебиения и дыхания. При отсутствии медицинских и правовых противопоказаний у данного контингента умерших пациентов (доноры с бьющимся сердцем) возможно проведение забора органов или тканей для трансплантации. Однако забор органов у пациентов с травматическим повреждением мозга может не выполняться из-за несвоевременного распознавания необратимого поражения мозга и раннего развития полиорганной дисфункции, возникающей вследствие травмы и СМ [7]. Поэтому прогнозирование возможного наступления смерти мозга у пациента позволит своевременно начинать протективную интенсивную терапию множества нарушений гомеостаза, связанных с СМ.

С целью прогнозирования СМ наиболее часто используют неврологическую оценку пациента (уровень сознания, наличие и выраженность рефлексов) и нейровизуализацию имеющихся повреждений мозга (МРТ, КТ и др.) [8]. У пациентов с необратимым повреждением и смертью мозга также наблюдаются выраженные и быстрые изменения ряда лабораторных показателей, связанных с развитием синдрома системного воспалительного ответа (число лейкоцитов, уровень интерлейкинов, С-реактивного белка и др.) [9].

Концентрация сывороточного железа является малоизученным острофазовым показателем у пациентов с тяжелым необратимым повреждением головного мозга [6]. У потенциальных доноров органов и тканей с необратимым повреждением головного мозга динамика уровня железа в сыворотке крови ранее не изучалась.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить предсказательную ценность определения уровня сывороточного железа как потенциального маркера наступления смерти головного мозга у пациентов с черепно-мозговой травмой на этапе проводимой интенсивной терапии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное нерандомизированное исследование было включено 107 пациентов с тяжелым травматическим повреждением головного мозга (черепно-мозговая травма), которые находились в ОАиР Могилевской области в 2018–2024 гг. На проведение исследования было получено согласие комитета по этике.

Возраст пациентов был 52 (39; 60) года; масса тела – 78 (70; 85) кг. Пациентов мужского пола было 83 (77,6%), женского – 24 (22,4%). Всем пациентам проводилась интенсивная терапия согласно протоколам лечения пациентов с тяжелым повреждением головного мозга, находящихся в критическом состоянии. При наличии показаний



и отсутствии противопоказаний пациентам проводилось хирургическое лечение – краниотомия с удалением внутричерепных гематом.

В зависимости от исхода полученного тяжелого повреждения мозга и интенсивной терапии были сформированы 2 группы пациентов: группа 1 (n=56) – пациенты, выписанные из стационара; группа 2 (n=51) – пациенты, у которых была констатирована смерть мозга. Констатация смерти мозга (приравнивается к биологической смерти) происходила врачебным консилиумом учреждения здравоохранения, где находился пациент, в соответствии с общепризнанными международными критериями и действующими нормативными правовыми актами Республики Беларусь (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 228 от 20.12.2008 «Об утверждении Инструкции о порядке констатации смерти»). Время от поступления пациента в стационар до начала процесса констатации смерти мозга было равно 88 (56; 129) ч.

Пациенты 2 групп статистически значимо не отличались по полу, возрасту и массе тела (см. таблицу). Однако пациенты группы 2 имели более длительный период ИВЛ до момента констатации биологической смерти. Оперативные вмешательства были проведены у 46 пациентов группы 1 и у 39 пациентов группы 2.

Пациентам обеих групп проводили необходимые лабораторно-инструментальные и клинические методы обследования согласно протоколам лечения и обследования пациентов с черепно-мозговыми травмами (приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 1110 от 24.09.2012 «Об утверждении инструкции о порядке организации оказания медицинской помощи пациентам с ЧМТ»). Дополнительно согласно цели исследования нами проводился анализ уровня сывороточного железа на 1, 2, 3, 5, 7 и 10-е сутки от поступления пациента в ОАиР или до момента биологической смерти (констатации СМ). Уровень сывороточного железа определяли на биохимическом анализаторе Beckman Coulter AU 680 (Beckman Coulter Inc., США) с помощью хромогена ТПТЗ колориметрическим методом. Метод осуществлялся согласно инструкции производителя оборудования и основан на диссоциации железа, связанного с трансферрином, в кислой среде на апотрансферрин и свободные ионы железа. Соляная кислота и аскорбат натрия восстанавливают Fe^{3+} до Fe^{2+} , который реагирует с ТПТЗ с образованием голубого комплекса, абсорбция которого измеряется бихроматически при базовой длине волны 590 нм. Увеличение значений абсорбции прямо пропорционально количеству железа в пробе, связанного с трансферрином.

Характеристика пациентов Characteristics of patients

Показатель	Группа 1, n= 56	Группа 2, n=51	p
Пол, муж./жен.	46/10	37/14	0,2**
Возраст, лет	53 (40; 61)	47 (38; 55)	0,2*
Масса тела, кг	75 (70; 82,5)	80 (70; 90)	0,1*
Время проведения ИВЛ, ч	10 (0; 240)	122 (101; 167)	0,003*
Оперативные вмешательства, n (%)	46 (82%)	39 (77%)	0,8**

Примечание: * критерий Манна – Уитни; ** χ^2 -квадрат Пирсона.

Статистический анализ полученных результатов был проведен с применением программ Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США) и MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия). Проверка полученных данных на нормальность распределения была проведена с применением теста Шапиро – Уилка (Shapiro – Wilk Test). Данные представлялись в виде медианы и квартилей (Me (LQ; UQ)) для количественных признаков и процентных соотношений для качественных признаков. С целью оценки значимости различий между независимыми группами использовали тест Манна – Уитни (Mann – Whitney U Test). Для оценки значимости отличий качественных признаков применяли критерий χ^2 (Pearson Chi-square test). Для определения лучшего классификатора неблагоприятного исхода оценивали коэффициенты логистической регрессии с построением ROC-кривых и вычислением площади под ними (AUC), констатацией диагностической чувствительности (Se) и диагностической специфичности (Sp). Нулевые гипотезы отвергались и отличия считались достоверными при $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень сывороточного железа в 1-е сутки интенсивной терапии в ОАиР в группе выживших пациентов составил 7,9 (4,1; 12,7) мкмоль/л, а в группе пациентов со смертью мозга – 5,4 (2; 11,9) мкмоль/л ($p=0,5$). Уровень сывороточного железа на 1-е сутки не являлся диагностическим фактором в плане констатации наступления смерти мозга: площадь под ROC-кривой была равна 0,585 (SE 0,129; 95% CI 0,437–0,722; $p=0,5$). На 2-е сутки интенсивной терапии отличий между обеими группами также выявлено не было: 4,9 (3,0; 8,6) мкмоль/л в группе 1 и 3,7 (2,3; 8,8) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,5$). Площадь под ROC-кривой для сывороточного железа на 2-е сутки составила 0,573 (SE 0,107; 95% CI 0,407–0,728; $p=0,5$).

На 3-и сутки интенсивной терапии было отмечено статистически значимое отличие между группами пациентов по уровню сывороточного железа: 5,1 (3,3; 9,8) мкмоль/л в группе 1 и 3 (2; 4,1) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,002$). Уровень сывороточного железа на 3-и сутки являлся весомым прогностическим фактором в плане суждения о наступлении смерти мозга: площадь под ROC-кривой была равна 0,767 (SE 0,0703; 95% CI 0,619–0,879; $p=0,0001$), cut-off value $\leq 3,2$ мкмоль/л (Se 58%, Sp 77,3%) (рис. 1).

На 5-е сутки интенсивной терапии также было отмечено статистически значимое отличие между группами пациентов по уровню сывороточного железа: 5,9 (2,5; 11,5) мкмоль/л в группе 1 и 3,4 (2,4; 4,4) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,03$). Уровень железа на 5-е сутки являлся умеренным прогностическим фактором в плане наступления смерти мозга: площадь под ROC-кривой 0,676 (SE 0,0802; 95% CI 0,529–0,801; $p=0,028$), cut-off value $\leq 4,7$ мкмоль/л (Se 80%, Sp 56%) (рис. 1).

На 7-е и 10-е сутки интенсивной терапии было отмечено статистически значимое отличие между группами пациентов по уровню сывороточного железа: на 7-е сутки – 6,8 (3,4; 13,5) мкмоль/л в группе 1 и 3,2 (2,4; 4,7) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,03$); на 10-е сутки – 7,1 (3,6; 11,6) мкмоль/л в группе 1 и 2,4 (1,6; 4,2) мкмоль/л в группе 2 ($p=0,02$).

Уровень железа на 7-е и 10-е сутки являлся значимым фактором оценки прогноза наступления смерти мозга (рис. 2). Площадь под ROC-кривой на 7-е сутки – 0,716 (SE 0,0795; 95% CI 0,556–0,844; $p=0,0066$), cut-off value $\leq 3,2$ мкмоль/л (Se 54%, Sp 75,9%); на 10-е сутки – 0,775 (SE 0,0962; 95% CI 0,611–0,894; $p=0,0043$), cut-off value $\leq 4,7$ мкмоль/л (Se 87,5%, Sp 60%).

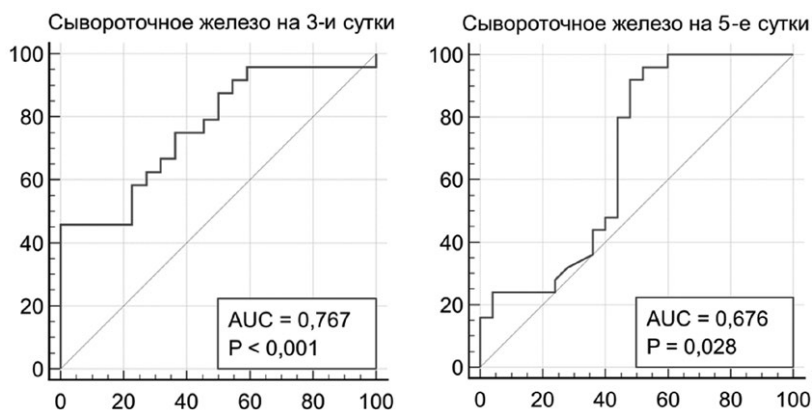


Рис. 1. ROC-кривые уровня сывороточного железа на 3-и и 5-е сутки как предиктора наступления смерти мозга у пациентов с травматическим повреждением головного мозга

Fig. 1. ROC curves of serum iron level on days 3 and 5 as a predictor of brain death in patients with severe traumatic brain injury

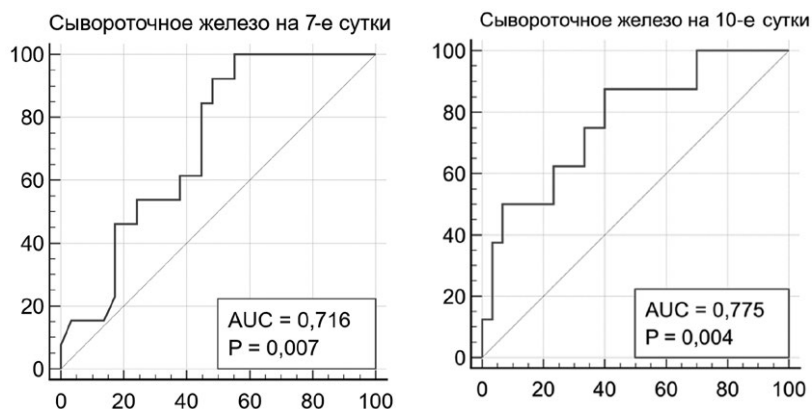


Рис. 2. ROC-кривые уровня сывороточного железа на 7-е и 10-е сутки как предиктора наступления смерти мозга у пациентов с травматическим повреждением головного мозга

Fig. 2. ROC curves of serum iron level on days 7 and 10 as a predictor of brain death in patients with severe traumatic brain injury

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что показатель сывороточного железа на 3, 5, 7 и 10-е сутки может являться прогностическим показателем скорого наступления смерти мозга у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой. С учетом того, что клиническая картина смерти мозга (арефлексия со ствола мозга и отсутствие спонтанного дыхания) отмечалась у пациентов в среднем с 88 ч (3–4-е сутки) от момента поступления, анализ сывороточного железа на 3-и сутки с точкой отсечения 3,2 мкмоль/л и менее с диагностической специфичностью 77,3% является дополнительным лабораторным признаком наступающей смерти мозга. Пациенты с данным уровнем сывороточного

железа требуют более частого проведения неврологической оценки рефлексов со ствола мозга с целью своевременной констатации смерти мозга.

Пациенты с благоприятным исходом лечения тяжелого повреждения мозга имели более высокий уровень сывороточного железа с 3-х суток от момента поступления. Наибольшее отличие в среднем уровне сывороточного железа между группами пациентов отмечалось на 7-е и 10-е сутки интенсивной терапии.

К настоящему времени имеется небольшое число исследований, в которых изучался уровень сывороточного железа у пациентов с травматическим повреждением головного мозга [5, 6]. В исследовании [5] было установлено, что уровень сывороточного железа снижается у пациентов с черепно-мозговой травмой, а предиктором летального исхода интенсивной терапии являются его показатели на 5-е сутки со времени поступления. При этом в другой научной работе отличий в уровне сывороточного железа у выживших и умерших пациентов с черепно-мозговой травмой на 2–4-е сутки выявлено не было [6].

Снижение уровня сывороточного железа всегда сопровождается синдром системного воспалительного ответа независимо от его инфекционной или неинфекционной причины [4]. Связано это с регуляцией метаболизма железа в организме человека посредством таких острофазовых белков, как ферритин, трансферрин и гепсидин.

Системное воспаление, возникающее при тяжелом повреждении тканей головного мозга, вызывает значительное снижение уровня сывороточного железа уже с 1-х суток произошедшей травмы. При данных травмах головного мозга свободное железо активно участвует в повреждении ткани мозга за счет образования гидроксильных радикалов и становления окислительного стресса [10]. Вероятно, что более выраженное снижение уровня сывороточного железа у пациентов со смертью мозга связано с более тяжелым по степени и объему повреждением головного мозга. К тому же тяжесть синдрома системного воспалительного ответа возрастает с развитием патофизиологических процессов, связанных с полиорганной дисфункцией при развитии клинической картины смерти мозга [11]. Это дает возможность использовать анализ содержания сывороточного железа как метод установления дополнительных критериев выраженности системного воспалительного ответа у пациентов при травматическом повреждении головного мозга.

Ограничением исследования является отсутствие данных о влиянии уровня кровопотери как вследствие черепно-мозговой травмы и проводимого оперативного вмешательства, так и в послеоперационном периоде во время интенсивной терапии. Обе группы пациентов, включенных в исследование, были сопоставимы по числу оперативных вмешательств, которые были однотипными. Необходимы дальнейшие исследования по изучению уровня сывороточного железа у пациентов со смертью мозга вследствие нетравматических повреждений головного мозга.

■ ВЫВОДЫ

1. Концентрация сывороточного железа у пациентов со смертью мозга была статистически значимо ниже на 3-и (3 (2; 4,1) мкмоль/л), 5-е (3,4 (2,4; 4,4) мкмоль/л), 7-е (3,2 (2,4; 4,7) мкмоль/л) и 10-е (2,4 (1,6; 4,2) мкмоль/л) сутки интенсивной терапии в сравнении с аналогичными показателями у пациентов с благоприятным исходом черепно-мозговой травмы.



2. Уровень сывороточного железа на 3-и (AUC=0,767), 5-е (AUC=0,676), 7-е (AUC=0,716) и 10-е (AUC=0,775) сутки интенсивной терапии может рассцениваться как фактор, отражающий наступление смерти мозга у пациентов с тяжелым травматическим повреждением головного мозга.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Darveau M, Denault AY, Blais N, Notebaert E. Bench-to-bedside review: iron metabolism in critically ill patients. *Crit Care*. 2004 Oct;8(5):356–62. doi: 10.1186/cc2862
2. Lipnitski AL, Marochkov AV, Savostenko IY, Vyukhina AV, Stavchikov EL, Tishkevich IG. Assessment of Surgical Invasiveness by the Dynamics of Serum Iron and C-Reactive Protein Levels. *Novosti Khirurgii*. 2023 Oct-Dec;31(6):431–438. doi: 10.18484/2305-0047.2023.6.431. (in Russian)
3. Bitkover CY, Hansson LO, Valen G, Vaage J. Effects of cardiac surgery on some clinically used inflammation markers and procalcitonin. *Scand Cardiovasc J*. 2000 Jun;34(3):307–14. doi: 10.1080/713783128
4. Grange C, Lux F, Brichart T, David L, Couturier A, Leaf DE, Allaouchiche B, Tillement O. Iron as an emerging therapeutic target in critically ill patients. *Crit Care*. 2023 Dec 4;27(1):475. doi: 10.1186/s13054-023-04759-1
5. Markevich DP, Marochkov AV, Livinskaya VA. Dynamics of the content of water-electrolytic exchange in patients with craniocerebral injury during the perioperative period. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2020;18(5):575–583. doi: 10.25298/2221-8785-2020-18-5-575-583. (in Russian)
6. Belatar B, Elabidi A, Barkiyou M, Faroudi ME, Eljaoudi R, Lahlou L, Kabbaj S, Maazouzi W. The influence of heavy metals and trace elements on comatose patients with severe traumatic brain injury in the first week of admission. *J Toxicol*. 2018;2018:Art 7252606. doi: 10.1155/2018/7252606
7. Watts RP, Thom O, Fraser JF. Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *J Transplant*. 2013;2013:521369. doi: 10.1155/2013/521369
8. Greer DM, Kirschen MP, Lewis A, Gronseth GS, Rae-Grant A, Ashwal S, Babu MA, Bauer DF, Billingham L, Corey A, Partap S, Rubin MA, Shutter L, Takahashi C, Tasker RC, Varelas PN, Wijdicks E, Bennett A, Wessels SR, Halperin JJ. Pediatric and Adult Brain Death/Death by Neurologic Criteria Consensus Guideline. *Neurology*. 2023 Dec 12;101(24):1112–1132. doi: 10.1212/WNL.0000000000207740
9. Lipnitski AL, Marochkau AV. Dynamics of indicators of systemic inflammatory response in patients with brain death. *Health and Ecology Issues*. 2024;21(4):53–59. doi: 10.51523/2708-6011.2024-21-4-06. (in Russian)
10. Yang G, Hu R, Zhang C, Qian C, Luo QQ, Yung WH et al. A combination of serum iron, ferritin and transferrin predicts outcome in patients with intracerebral hemorrhage. *Scientific Reports*. 2016 Feb 22;6:21970. doi: 10.1038/srep21970
11. Schwarz P, Custódio G, Rheinheimer J, Crispim D, Leitão CB, Rech TH. Brain Death-Induced Inflammatory Activity is Similar to Sepsis-Induced Cytokine Release. *Cell Transplant*. 2018 Oct;27(10):1417–1424. doi: 10.1177/0963689718785629



Adian Abd Alrazak Dakl^{1,2}✉, Ikram Abbas Aboud Al-Samrrae¹

¹ College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

² College of Science, University of Al Muthana, Al Muthana, Iraq

Study the Role of Ethanolic Leaves Extract of Albizia Lebbeck as an Immunomodulator in Response to Klebsiella Pneumoniae Infection in Animals

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Adian Abd Alrazak Dakl – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, validation, visualization, writing – original draft and editing; Ikram Abbas Aboud Al-Samrrae – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, visualization, writing – original draft and editing.

The article is published in author's edition.

Submitted: 20.08.2024

Accepted: 19.05.2025

Contacts: adian.abd@mu.edu.iq

Abstract

Introduction. The Albizia lebbeck leaf contains several phytochemicals that exhibit a range of pharmacological effects, including antibacterial, anti-inflammatory and immunomodulatory actions. It has been applied to treat a variety of inflammatory disorders and ailments. The combined effects of an ethanolic Albizia lebbeck leaf extract and Killed Whole Cell Sonicated Ag-Klebsiella pneumoniae (KWCSAg-KP) was studied in an in vivo environment.

Purpose. To evaluate Albizia lebbeck's role as an immunomodulator and estimate the immunological response of rabbits immunized with Klebsiella pneumoniae sonicated antigen and various concentrations of Albizia lebbeck extract.

Materials and methods. There were a total of five groups of eight rabbits in the experiment. Group 1 received subcutaneous immunisation with 1000 µg/ml (mg/l) KWCSAg-KP. The second group received oral Albizia lebbeck extract (300 mg/kg) and subcutaneous KWCSAg-KP immunisation (1000 µg/ml (mg/l)). The third group was administered 1000 µg/ml (mg/l) KWCSAg-KP subcutaneously and 150 mg/kg Albizia lebbeck extract orally. The oral dosage of Albizia lebbeck extract for the fourth group receive 300 mg/kg only. the fifth group was given PBS as a control. Results were evaluated by measuring Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) and interleukin-4 (IL-4), IgG levels using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). Gas chromatography-mass spectrometry analysis was used to test the ethanol extract of Albizia lebbeck. The acute toxicity of the drug was determined. Modern high-tech methods of Klebsiella pneumoniae isolation and identification were used. To determine interleukin 4 and immunoglobulins G, an enzyme-linked immunosorbent assay was applied using ELISA Kits (Rabbit Immunoglobulin G and Rabbit Interleukin 4).

Results. The mean diameter of induration at 48 hours increased in the first three groups, whereas it decreased in the fourth group during the whole post-injection period, according to DTH performed 21 days after vaccination. The second group also had the greatest concentration of IgG and IL-4 at 28 days, according to the ELISA value.



Conclusion. It was concluded that the *Albizia lebbeck* extract modulates immunological and cellular markers of inflammation and immunity.

Keywords: *albizia lebbeck*, delayed type hyper sensitivity, immunomodulatory, immunoglobulin-G, *Klebsiella pneumoniae*, Interlukine-4

Адиан Абд Альразак Дакл^{1,2}✉, Икрам Аббас Абуд Аль-Самрраи¹

¹ Колледж ветеринарной медицины, Университет Багдада, Багдад, Ирак

² Научный колледж, Университет Аль-Мутанна, Аль-Мутанна, Ирак

Исследование роли этанолового экстракта листьев растения *Albizia lebbeck* в качестве иммуномодулятора организма животных в ответ на заражение *Klebsiella pneumoniae*

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Адиан Абд Альразак Дакл – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Икрам Аббас Абуд Аль-Самрраи – концепция, научное руководство, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 20.08.2024

Принята: 19.05.2025

Контакты: adian.abd@mu.edu.iq

Резюме

Введение. Листья растения *Albizia lebbeck* содержат некоторые фитохимически синтезируемые вещества, обладающие рядом ценных фармакологических свойств, в том числе антибактериальным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действием. Их применяют при различных воспалительных реакциях и расстройствах. Сочетанное воздействие этанолового экстракта листьев *Albizia lebbeck* и цельных (неразрушенных) «убитых» клеток *Ag-Klebsiella pneumoniae*, обработанных ультразвуком (KWCSAg-KP), исследовали в условиях *in vivo*.

Цель. Определить роль *Albizia lebbeck* в качестве иммуномодулятора и оценить иммунологическую реакцию кроликов, которым вводили антиген *Klebsiella pneumoniae*, обработанный ультразвуком, и экстракт *Albizia lebbeck* в различных концентрациях.

Материалы и методы. Для эксперимента было сформировано пять групп кроликов – по восемь особей в каждой. Кроликам первой группы вводили KWCSAg-KP в концентрации 1000 мкг/мл (мг/л) подкожно. Вторая группа получала экстракт *Albizia lebbeck* (300 мг/кг) перорально и KWCSAg-KP (1000 мг/л) подкожно. Кролики третьей группы получали 1000 мг/л KWCSAg-KP подкожно и 150 мг/кг экстракта *Albizia lebbeck* перорально. Пероральная доза экстракта *Albizia lebbeck* для четвертой группы составила 300 мг/кг. Пятая группа была контрольной и получала физиологический раствор, забуференный фосфатом. Результаты оценивали путем измерения уровня

гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и концентрации интерлейкина-4 (IL-4), а также уровня IgG с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). Для исследования этанолового экстракта *Albizia lebbeck* использовался газово-хроматографический – масс-спектрометрический анализ. Устанавливалась острая токсичность препарата. Были применены современные, высокотехнологичные методы изоляции и идентификации *Klebsiella pneumoniae*. Для определения IL-4 и IgG использовался иммуноферментный анализ с применением наборов реагентов ELISA Kits (Rabbit Immunoglobulin G and Rabbit Interleukin 4).

Результаты. Средний диаметр индукции увеличился в течение 48 часов в первых трех группах, в то время как в четвертой группе он снижался в течение всего постинъекционного периода, о чем свидетельствовали результаты измерения ГЗТ, проведенного через 21 день после иммунизации. Иммуноферментный анализ выявил наибольшие концентрации IgG и IL-4 на 28-й день во второй группе.

Заключение. По результатам исследования был сделан вывод, что экстракт *Albizia lebbeck* модулирует иммунологические и клеточные маркеры воспаления и иммунитета.

Ключевые слова: *Albizia lebbeck*, гиперчувствительность замедленного типа, иммуномодулирующее средство, иммуноглобулин G, *Klebsiella pneumoniae*, интерлейкин-4

■ INTRODUCTION

Herbal and herbo-mineral preparations are widely utilized in traditional medical systems. For a very long time, plants have been a rich source of natural materials that have maintained the health of humans and animals [1, 2]. The undeniable safety and efficacy of medicinal plants in treating chronic inflammatory diseases have been substantiated [3, 4]. A survey by the "World Health Organization (WHO)" indicates that a significant proportion of individuals in most countries rely on traditional medicines for primary health concerns [5]. The principal advantages of herbal medicines lie in their safety and efficacy, often accompanied by minimal adverse effects, even with prolonged use [6]. Physiological levels of inflammatory reactions are crucial for cellular functions and survival; and are self-regulated and self-controlled. However, chronic and lethal concentrations can lead to severe damage to visceral organs, including the brain, heart, lungs, liver, kidneys, pancreas, and reproductive systems. Uncontrolled inflammatory responses or chronic immune cell activation contribute to lifestyle diseases such as rheumatoid arthritis, diabetes, hypertension, and obesity [7]. Chronic inflammation in any part of the body poses serious complications for human health systems. Although corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory agents suppress inflammation, their prolonged use results in potent unwanted side effects [8].

The genus *Albizia*, a member of the Fabaceae family, commonly known as Sirisha, is a deciduous tree grown in tropical and subtropical regions worldwide. It is known for its rich content of bioactive secondary metabolites such as flavonoids, tannins, saponins, terpenes, and alkaloids. Traditionally, *Albizia* plants have been employed to treat various inflammatory pathologies such as asthma, arthritis, and burns. In addition to several ailments, including diarrhea, cough, anxiety, depression, insomnia, rheumatism, wounds, and inflammatory and ROS-related disorders [9].



The leaves of *Albizia lebbeck* contain flavonoids, echinocystic acid, β -sitosterol, and vicienin II. Modern reports of the bioactive materials of *Albizia lebbeck* detected that the plant possesses antimicrobial [10], anti-inflammatory [11], analgesic, immunomodulatory [12], antioxidant [13], hepatoprotective, anxiolytic, anticonvulsant, antidiarrheal properties [14].

Due to the importance of *Klebsiella pneumoniae* as the worldwide pathogen, and its ability to develop resistance to multiple antibiotics, including those commonly used to treat bacterial infections, which can make infections more difficult to treat and result in prolonged illness, there has become an urgent need to find an alternative treatment from pathogen-specific active vaccination and passive antibody therapy in addition to natural extracts such as *Albizia lebbeck* leaves extract.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To evaluate *Albizia lebbeck*'s role as an immunomodulator and estimate the immunological response of rabbits immunized with *Klebsiella pneumoniae* sonicated antigen and various concentrations of *Albizia lebbeck* extract.

■ MATERIALS AND METHODS

Plant material

Albizia lebbeck leaves were collected from veterinary medicine collage gardens at the University of Baghdad, Baghdad, Iraq. The plant samples were authenticated by the Department of Biological Sciences, Sciences College, Baghdad University. The leaves were pulverized after being shaded and dried at room temperature. The powdered plant material was extracted using 96% ethanol (1 : 10) as a solvent in a Soxhlet apparatus for 16 hours. After being subjected to an incubator set at 60 °C for 12 hours, the resulting dark green extracts were then refrigerated to remove any remaining solvents [15].

Gas chromatography – mass spectrometry (GC–MS) analysis

Gas chromatography – mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed by Industrial Research and Development Authority, Ibn Al-Bitar Research Center, Iraqi Ministry of Industry and Minerals, Baghdad, Iraq. The GC–MS analysis was conducted via the use of a Agelint (7820A) USA GC–MS equipped with an Agelint HP-5 MS fused silica capillary column. The volume of the sample (*Albizia lebbeck* extract) injected in to GC is 1 μ L was applied with a pressure of 11.93 psi. The injection type is specified as splitless. The injector temperature was set at 250 °C, and scan range of m/z 25–1000. The carrier gas was helium with a purity of 99.99 %. The oven temperature program included four ramps: ramp 1 was 60 °C and held for 3 minutes, ramp 2 was 60 °C to 180 °C at a rate of 7 °C per minute, ramp 3 was 180 °C to 280 °C at a rate of 8 °C per minute, ramp 4 was held at 280 °C for 3 minutes. Identification of components within the crude extract relied on its retention time indices, and MS solution software provided by supplier to control the system and to acquire the data.

Acute toxicity test

The acute toxicity test for the ethanolic *Albizia lebbeck* extract was conducted using the up-and-down method, according to [16]. Overnight-fasted albino mice, organized into groups of six animals each, were employed for the study. The extract was administered at

an initial single dose of 2000 mg/kg b.w. The animals were closely observed for a 2-hour period, followed by intermittent observations over the next 4 hours to assess the severity of any toxic signs and mortality. In the absence of observed mortality, the same dose was administered to an additional animal. If no mortality occurred at this dose, the same procedure was iterated for dose levels of 3000, 4000 mg/kg b.w. of the extract in separate and subsequent groups.

Isolation and identification of Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae was isolated and subjected to diagnosis employing MacConkey agar, Hi-Crome ESBL agar base, and Hi-Crome Klebsiella Selective agar base culture media and subsequently confirmed through polymerase chain reaction (PCR), specifically targeting the 16S rRNA gene [17, 18].

Antigen preparation: Killed whole cell sonicated antigen of Klebsiella pneumoniae (KWCSA-KP)

The Killed Whole-Cell Sonicated Antigen of Klebsiella pneumoniae (KWCSAKP) was prepared in accordance with the procedure outlined by reference [19, 20]. After the growth of bacteria on the agar plate, 3 mL of a 0.6% solution of Formalised Phosphate Buffer Saline (FPBS) was added to collect the Klebsiella pneumoniae. Afterwards, the growth was properly scraped, and each medium was placed in separate sterile tubes. The substance was subjected to centrifugation at a speed of 3000 revolutions per minute, which was repeated three times. The tube obtained was placed in a refrigerator for the entire night. The following day, the collected material was assessed for its ability to survive, considering the approach successful if no signs of growth were detected. The bacteria from the universal tube were subjected to sonication for 30 minutes using a 250 kHz probe sonicator in a cooled atmosphere after being killed and thawed. The sonicated sample was subsequently incubated on MacConkey agar and subjected to centrifugation at 3000 rpm for 20 minutes to evaluate its viability. The liquid portion was collected, passed through a 0.45 µ Millipore filter, and kept at a temperature of -20 °C.

Animals

The animal house of the University of Baghdad's College of Veterinary Medicine was scouted for forty Albino rabbits, both male and female, with an age range of 6 to 12 months and a weight range of 1000 to 1500 grams. In a controlled environment, the animals were kept according to conventional protocols.

Experimental design

The animals were stratified into five groups, with each group comprising 8 rabbits. In the first group, immunization involved the administration of 1000 µg/ml (mg/l) KWCSAg-KP. The second group received 300 mg/kg Albizia lebbeck extract alternated with immunization of 1000 µg/ml (mg/l) KWCSAg-KP, beginning a week prior to day 1 of the experiment and continuing on alternate days. The third group underwent a similar regimen but with a dosage of 150 mg/kg Albizia lebbeck extract. The 4th group was immunized with 300 mg/kg Albizia lebbeck. The 5th group, serving as the control, received PBS. Booster doses were administered on the 14th day for the 1st, 2nd, and 3rd groups of KWCSAg-KP. Additionally, the 2nd and 3rd groups received an extra dose.



On the 21st day, a skin test was conducted to assess Delayed-Type Hypersensitivity (DTH); cellular immunity. Blood collection for ELISA tests: IgG and IL-4 by cardiac puncture from all groups, occurred on the 28th, 42nd, and 56th days for all groups.

The Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) skin test

The Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) skin test, conducted following the labeling technique according to [21], involved dividing the flank area of the forty rabbits into four injection quarters. After clipping and shaving, 0.1 ml of KWCSAg (crude Ag, diluted 1 : 2 Ag, diluted 1 : 4 Ag, and PBS – pH 7.2) was intradermally injected to all immunized groups. Skin induration at the injection sites was measured by Vernier after 24, 48, and 72 hours.

ELISA test

ELISA Kits (Rabbit Immunoglobulin G and Rabbit Interleukin 4) were employed for the enzyme-linked immunosorbent assay of IL-4 and IgG in rabbit serum, following the instructions outlined in the manual.

Statistical study

The data was statistically analysed using SPSS version 26. Comparing more than two groups required the use of a one-way analysis of variance (ANOVA). For a P-value less than 0.05 to be regarded statistically significant, and for a P-value of 0.01 or less to be considered highly significant [22].

■ RESULTS

Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) analysis of *Albizia lebbeck*

The crude extract of *Albizia lebbeck* was analysed using GC-MS, which revealed the following major components: Heptanedioic acid, dimethyl ester (1.21%), hexadecanoic acid, methyl ester (11.99%), Pentadecanoic acid (5.39%), 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-methyl ester (7.62%), 9-Octadecenoic acid, methyl ester (21.20%), 11-Octadecenoic acid, methyl ester (3.58%), methylstearate (6.05%), 2-Methyl-Z,Z-3,13octadecadienol (21.20%), 3,13octadecadienol (21.20%), Heptane, 1-(ethenylthio) (2.58%) and N-Trifluoroacetylimidazole (1.13%). The compounds mentioned above have retention times of 17.158, 20.205, 20.785, 22.404, 22.499, 22.585, 22.819, 23.053, 23.321, and 28.402, respectively.

Acute toxicity of *Albizia lebbeck*

Administration of ethanolic *Albizia lebbeck* leaf extract was reported therapeutically safe up to 2000 mg/kg b.w. at dose 3000 mg/kg b.w. and mice appeared normal throughout the study.

Identification of *Klebsiella pneumoniae* by PCR

The DNA extraction from three *K. pneumoniae* isolates was made by the (Favor prep blood / cultured cells genomic DNA extraction mini kit, FAVORGEN/Korea). The purity and the concentration of DNA ranged from (45-95-97) ng/ul, respectively. All three isolates in this study showed a PCR product with 1250 bp by *Klebsiella pneumoniae* according to the amplified piece of the 16S rRNA gene that performed *Klebsiella pneumoniae* [23] (Fig. 1).

Delayed Type Hypersensitivity (DTH) – Skin test

The delayed-type hypersensitivity skin test (DTH) assessed cellular immune response, focusing on induration 21 days after immunisation. The findings indicate substantial differences across groups in the second phase ($P<0.05$). Fig. 2A indicates that the first group consistently had a higher mean induration ($P<0.05$) than the other groups (Fig. 2B–D). The fourth group’s mean induration fell (Fig. 2D). Time differences were not statistically significant for any group.

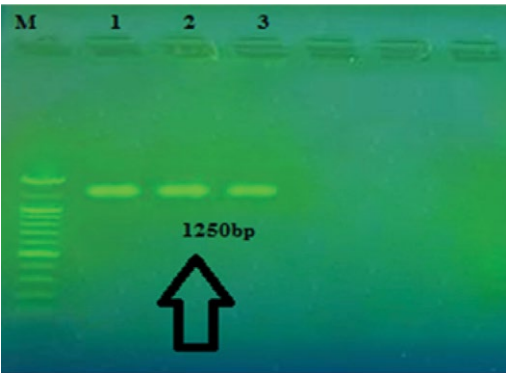


Fig. 1. PCR product the 16S rRNA

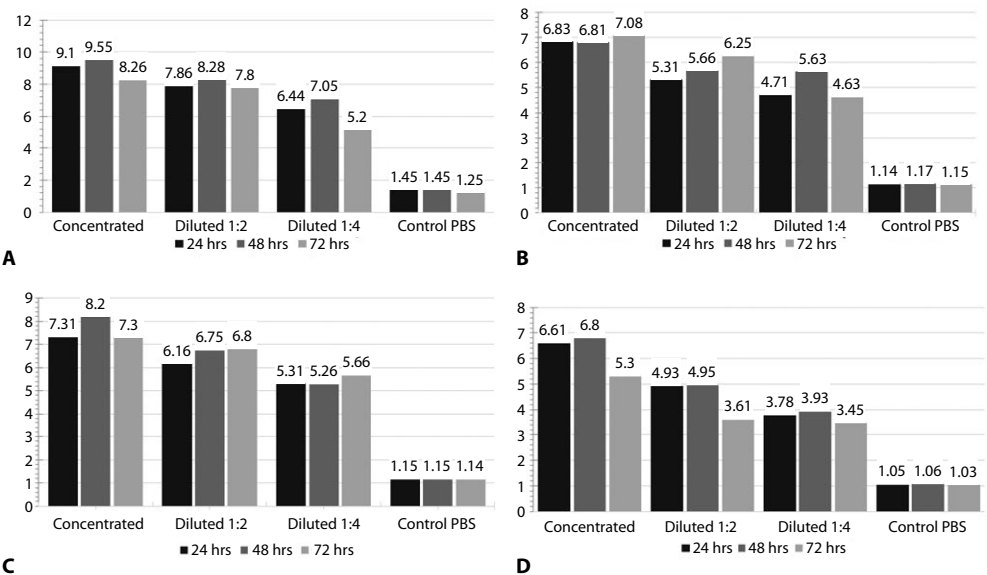
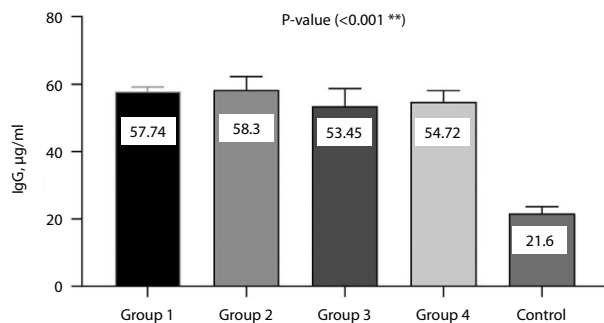
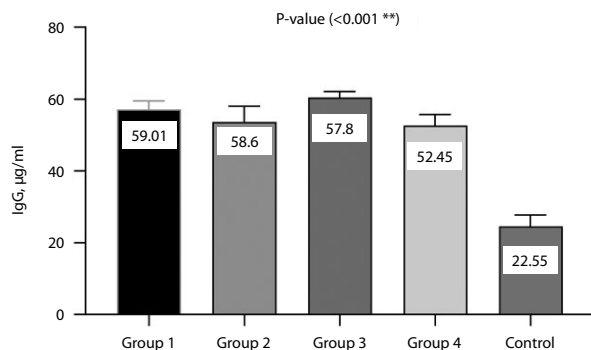


Fig. 2. A – Mean of induration of DTH-Skin test in rabbits immunized by (KWCSA-KP) 1000 µg/ml; B – Mean of induration of DTH-Skin test in rabbits immunized by (KWCSA-KP) 1000 µg/ml + Albizia 300 mg/kg; C – Mean of induration of DTH-Skin test in rabbits immunized by (KWCSA-KP) 1000 µg/ml + Albizia 150 mg/kg; D – Mean of induration of DTH-Skin test in rabbits immunized by Albizia 300 mg/kg



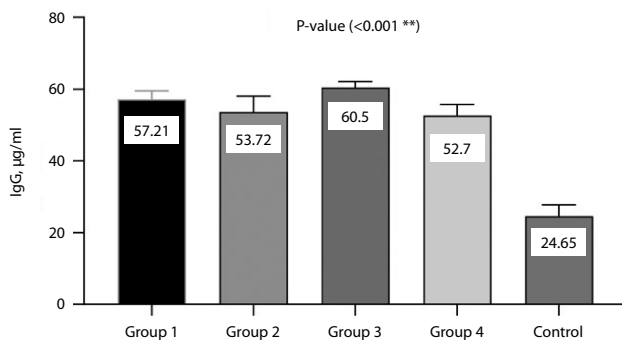
Immunized and control serum samples after 28 day

A



Immunized and control serum samples after 42 day

B



Immunized and control serum samples after 56 day

C

Fig. 3. A – Mean of IgG concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbek extract. Mean of negative control 21.6, SE 0.61, 1.6, 2.16, 1.37 and 0.82 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.001$; B – Mean of IgG concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbek extract. Mean of negative control 22.55, SE 0.68, 0.99, 1.03, 1.39 and 1.02 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.001$; C – Mean of IgG concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbek extract. Mean of negative control 24.65, SE 0.96, 1.78, 0.67, 1.25 and 1.26 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.001$

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
The ELISA test measured Immunoglobulin G and Interleukin-4 levels. Antibody concentration measures the humoral immune response and the immune system's ability to create essential antibodies. Immunization days 28, 42, and 56 yielded serum. The study found significant differences ($P<0.05$) among groups throughout three timeframes.

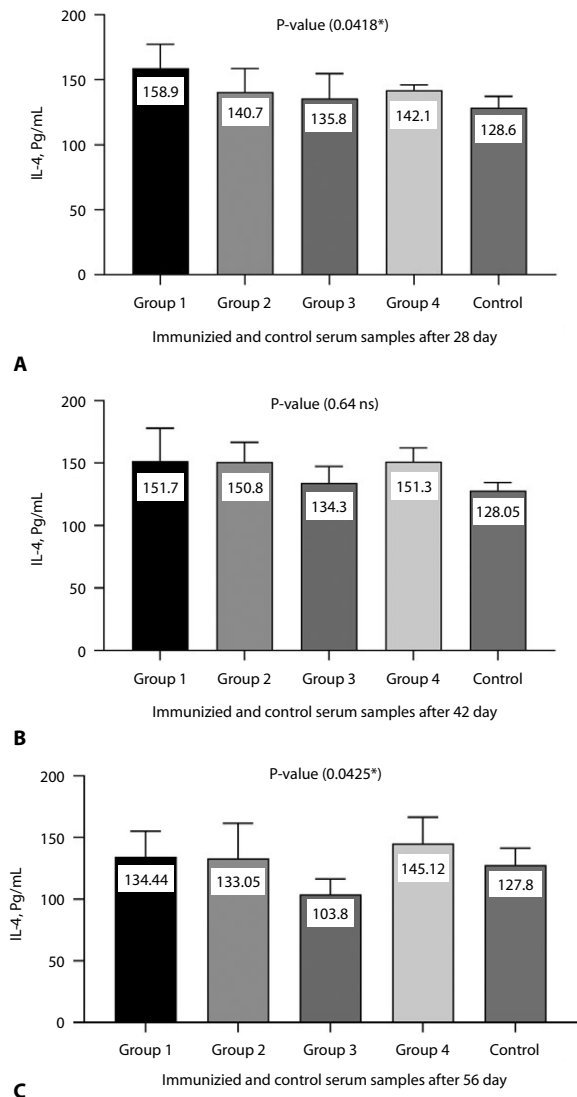


Fig. 4. A – Mean of IL-4 concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbck extract. Mean of negative control 128.6, SE 18.51, 18.12, 18.41, 20.61 and 8.57 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.0418$; B – Mean of IL-4 concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbck extract. Mean of negative control 128.05, SE 16.8, 15.82, 5.38, 13.96 and 6.48 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.064$; C – Mean of IL-4 concentration in rabbits immunized by KWCSAg-KP and Albizia lebbck extract. Mean of negative control 127.8, SE 6.83, 8.53, 12.51, 18.8 and 13.61 of Group 1, 2, 3, 4, 5, respectively, $P=0.0425$



The mean IgG concentration was higher in the 1st, 2nd, 3rd and 4th groups in comparison with the 5th group, and the difference was significant ($P<0.05$) and a highly significant ($P=0.001$) for the three periods. The differences among periods within the 1st, 2nd and 3rd groups were not significant for these groups (Fig. 3).

Results showed substantial differences ($P<0.05$) among groups throughout the three periods. The 3rd group had substantially lower IL-4 concentrations ($P<0.05$) than the other groups during all periods (Fig. 4, A and B), whereas the 4th group had a reduced mean concentration at the first 28-day period (Fig. 4C).

■ DISCUSSION

This study estimated rabbits' immune responses to *Klebsiella pneumoniae* sonicated antigen and varied amounts of *Albizia lebbeck* leaf extract adjuvant. Due to the importance of finding a suitable adjuvant that can modulate the immune response. Various studies have been launched "to study the effects of herbal immunisation on the humoral and cellular immune system". Previous studies have observed the immunological interaction and synergy between herbal adjuvants of *Syzygium aromaticum* and *Salmonella typhimurium* antigens, showing enhancement of antibody levels showing that the synergetic effects have boosted the immune system [24].

In another study, *Albizia lebbeck* extract-treated animals had greater serum antibody titers than vehicle-treated mice and had effects similar to muramyl dipeptide. Showing that adjuvants dramatically boost antibodies [25]. These studies agreed with our results about the high concentration of IgG levels in immunised groups with *Albizia lebbeck*.

The findings of this study indicate that the addition of the herbal extract of *Albizia lebbeck* as an adjuvant resulted in a reduction in cell-mediated immunity, as determined by DTH. This reduction was observed for the KWCSAg-KP and 300 mg/kg of the adjuvant group, indicating that the extract of *Albizia lebbeck* has an anti-inflammatory effect. This finding is in agreement with the findings of [25], who have reported the suppression of delayed type hypersensitivity responses due to administration of *Albizia lebbeck* bark extract once daily for one week in mice who immunized were with sheep red blood cells.

Measuring the levels of IL-4, a potent regulator of immunological and inflammatory responses, was the second assessment of cellular immunity. The groups that received KWCSAg-KP vaccinations showed lower levels of IL-4 following prior treatment with *Albizia lebbeck* extract. This finding is compatible with the findings of a study by [26], which confirmed the extract's "immunomodulatory effects", which demonstrated a significant reduction in the levels of eosinophils, neutrophils, OVA sIgE, TNF- α , IL-6, and IL-4 while increasing the levels of IFN- γ in both blood and BAL fluid from rats.

In other studies, documented the anti-inflammatory properties of the leaf extract [27]. Furthermore [28, 29] Pramanik have shown that the methanol extract of *Albizia lebbeck* bark had anti-inflammatory activities. Additionally, research has shown that *Albizia* root extract enhances the sensitivity of guinea pigs to antigen challenge, hence impeding the first sensitization phase and the production of reaginic type antibodies [30]. Additionally, it decreased histamine levels and increased plasma cortisol in guinea pigs who were exposed to antigens [31].

CONCLUSION

The present investigation supported that the ethanolic extract of Albizia lebbeck leaves had the intended immunomodulatory effects. This study confirmed the alteration of cellular and molecular markers of inflammation and immunity in the models.

REFERENCES

1. Abood A. Antimicrobial resistance of tannin extract against E. coli isolates from sheep. *Archives of Razi Institute*. 2022;77(2):697. <https://doi.org/10.22092/FARI.2022.356982.1955>
2. Hasan HF, Al-Samarai FR, Fahmi ZM. Hematological and antioxidant effect of arctium lappa leaves extract on female rats treated with chlorambucil. *Biochemical & Cellular Archives*. 2020;20(1).
3. Kishore N, Kumar P, Shanker K, Verma AK. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. *European journal of medicinal chemistry*. 2019;179:272–309. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.034>
4. Bakheet N, Al-Qayim M, Falih I. Intestinal anti-inflammatory improvement with fenugreek seeds as a prebiotic and synbiotic with Lactobacillus acidophilus in rats experimentally infected with Escherichia coli. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2020;44(2):1–14. <https://doi.org/10.30539/ijvm.v44i2.984>
5. Khan MSA, Ahmad I. Herbal medicine: current trends and future prospects. New look to phytomedicine: Elsevier; 2019; pp. 3–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00001-X>
6. Awuchi CG. Medicinal plants: the medical, food, and nutritional biochemistry and uses. *International Journal of Advanced Academic Research*. 2019;5(11):220–41.
7. Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmberg JP. Inflammation – nature's way to efficiently respond to all types of challenges: implications for understanding and managing "the epidemic" of chronic diseases. *Frontiers in medicine*. 2018;5:316. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
8. Mujawdiya PK, Kapur S. Screening of antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of Indian medicinal plants. *Current Enzyme Inhibition*. 2020;16(2):145–54. <https://doi.org/10.2174/1573408016666200414153108>
9. Sobeh M, Hassan SA, El Raey MA, et al. Polyphenolics from Albizia harveyi exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. *Molecules*. 2017;22(11):1993. <https://doi.org/10.3390/molecules22111993>
10. Labaran I, Lukman OA, Adam JD, Usman M. Analysis of some phytochemicals and minerals found in aqueous stem bark of Albizia lebbeck. *Dutse Journal of Pure and Applied*. 2016;2(1):231–237.
11. Gupta M, Mazumder UK, Kumar TS, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of Bauhinia racemosa against paracetamol and carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Iranian J. Pharmacol. Therapeut*. 2004;3:12–20.
12. Saidu Y, Bilbis L, Lawal M, et al. Acute and sub-chronic toxicity studies of crude aqueous extract of Albizzia chevalieri Harms (Leguminosae). 2007;2(4):224–236. DOI: 10.3923/ajb.2007.224.236
13. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*. 2001;73(1):73–84. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00288-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00288-0)
14. Chaudhary M, Sharma AK, Kumar R, et al. Comparative immunomodulator activity of leaves and bark of albizia Lebbeck (linn.) Benth. *Int J Res Dev Pharm L Sci*. 2012;1(1):25–7.
15. Meshram GG, Kumar A, Rizvi W, et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of Albizzia lebbeck in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2016;6(2):172–5. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.038>
16. Suman A, Prasad M. Antiinflammatory activity of Albizia lebbeck (L.) BENTH. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2019;9(4-s):1123–8.
17. Qasim DA, Lafta IJ, Ilyola OA. Antibacterial Activity of Lactiplantibacillus plantarum from Dairy Products Against Some Foodborne Bacteria. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2023;47(1):44–51. <https://doi.org/10.30539/ijvm.v47i1.1500>
18. Abdulridha RN, Salieem AH. Effect of Ultrasonic Extract of Capparis spinosa Fruits Against E. coli O157: H7. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2023;47(1):86–92. <https://doi.org/10.30539/ijvm.v47i1.1529>
19. Mitov I, Denchev V, Linde K. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of Salmonella typhimurium: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine*. 1992;10(1):61–6. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90421-F](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90421-F)
20. Al-Samarrae EA. Humoral immune response of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis sonicated antigens in rabbits: AL-Samarrae. EAA, AL-Shawi, AMA and AL-Taiy, HSR. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*. 2012; 36(0E):84–8.
21. Hudson L, Hay F. Antibody effector systems. Practical immunology, 2nd edn Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1980:142–5.
22. Daniel WW, Cross CL. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences: Wiley; 2018.
23. Alyassari A, Neamah AJ, Alshammari MMM. Israa najm Abdullah Al-Ibadi, Genotypic Characterization of Klebsiella pneumoniae Isolated from Human and Sheep in Al-Qadisiyah Province, Iraq. *J Pure Appl Microbiol*. 2019;13(3):1783–9. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.3.54>
24. Al-Juburi LI, Ikram AA-S. Syzygium aromaticum extract as an adjuvant to enhance the immune response of rabbits against salmonella typhimurium. *International Journal of Health Sciences*. 2023;6(57):6767–6774. Retrieved from <https://sciencescholar.us/journal/index.php/ijhs/article/view/13827>
25. Barua C, Gupta P, Patnaik G, et al. Immunomodulatory effect of Albizzia lebbeck. *Pharmaceutical biology*. 2000;38(3):161–6. [https://doi.org/10.1076/1388-0209\(200007\)3831-SFT161](https://doi.org/10.1076/1388-0209(200007)3831-SFT161)
26. Sulekha Chaudhary SC, Kavita Gulati KG, Nishant Rai NR, Arunabha Ray AR. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Albizia lebbeck in experimental model of bronchial asthma. *The Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences*. 2022;60(3):147–152. DOI: 10.5005/ijcdas-60-3-147
27. Mohamed TK, Nassar MI, Gaara AH, et al. Secondary metabolites and bioactivities of Albizia anthelmintica. *Pharmacognosy research*. 2013;5(2):80. <https://doi.org/10.4103/F0974-8490.110530>
28. Das AK. Anti-inflammatory Effect of Albizzia lebbeck (Benth.) Bark Ashish K. Das, Firoj Ahmed, "SC Bachar", J. Kundu and Shrabanti Dev. *Online Journal of Biological Science*. 2003;3(8):685–7.
29. Pramanik K, Bhattacharya P, Chatterjee T, Mandal S. Anti inflammatory activity of methanol extract of Albizzia lebbeck (Mimosaceae) bark. *Eur Bull Drug Res*. 2005;13:71–5.
30. Tripathi R, Sen P, Das P. Studies on the mechanism of action of Albizzia lebbeck, an Indian indigenous drug used in the treatment of atopic allergy. *Journal of ethnopharmacology*. 1979;1(4):385–96. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(79\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(79)80003-3)
31. Tripathi S, Shukla P. Effect of histamine & Albizzia lebbeck Benth on guineapig adrenal glands. *Indian journal of experimental biology*. 1979;17(9):915–7.



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.4.013>



Ahmed Remthane Hussein✉, Manal Badi Saleh, Sabah Hussain Enayah
College of Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq

Anti-Biofilm and Antibacterial Activity of *Zygophyllum Coccineum* Extract Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus*

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Ahmed Hussein – conceptualization, methodology, project administration, resources, software, writing – original draft and editing; Manal Saleh – conceptualization, data curation, methodology, project administration, writing – original draft and editing; Sabah Enayah – conceptualization, data curation, project administration, resources, writing – original draft and editing.

The article is published in author's edition.

Submitted: 02.05.2025

Accepted: 16.10.2025

Contacts: ahmed.ramthan@utq.edu.iq

Abstract

Introduction. The excessive rise in the development of drug-resistant bacterial strains is considered to be one of the greatest hazards to human society.

Purpose. To use plant extracts as safe antibiotics with few side effects to reduce this type of strains, especially those that are part of the medical microbiome of humans, such as *Staphylococcus*.

Materials and methods. *Zygophyllum coccineum* extracted, the ethanol and aqueous extracts were used against drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patient in hospitals and private clinics. It was used as an antimicrobial and at the same time as an inhibitor of biofilm formation. Both antibacterial and anti-biofilm activity of aqueous and alcoholic extracts of the plant were investigated.

Results. *Staphylococcus aureus* isolates were resistant to antibiotics (Azithromycin, Erythromycin, Doxycycline, Tetracycline, Ciprofloxacin, Cefoxitin, and Penicillin) with percentages of 60%, 55%, 45%, 50%, 45%, 55%, and 100% respectively. The concentration of the alcoholic extract at 200 and 100 µg/ml (mg/l) was more effective on the bacterial isolates, as was the aqueous extract at 200 µg/ml (mg/l). It was found that there was a significant inhibition of biofilm formation at a concentration of 50, by 77.7%.

Conclusion. The alcoholic extract of the *Zygophyllum coccineum* was more effective in terms of its effect on bacteria is multi drug-resistant and also, in the formation of biofilms.

Keywords: *Zygophyllum coccineum*, drug-resistant, biofilm formation, *Staphylococcus aureus*, alcoholic extract

Ахмед Ремтане Хуссейн✉, Манал Бади Салех, Сабах Хуссейн Энайя
Научный колледж, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, Ирак

Антибиопленочная и антибактериальная активность экстракта растения *Zygophyllum coccineum* (парнолистник алый) в отношении мультирезистентного *Staphylococcus aureus*

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Ахмед Хуссейн – концепция, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, написание чернового варианта статьи, редактирование; Манал Салех – концепция, обработка данных, методология, ведение проекта, написание чернового варианта статьи, редактирование; Сабах Энайя – концепция, обработка данных, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, ресурсы, написание чернового варианта статьи, редактирование. Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 02.05.2025

Принята: 16.10.2025

Контакты: ahmed.ramthan@utq.edu.iq

Резюме

Введение. Стремительный рост числа штаммов бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам, представляет собой одну из наиболее серьезных угроз для человеческого общества.

Цель. Оценить возможность использования экстрактов растения парнолистник алый (*Zygophyllum coccineum*) в качестве безопасных с проявлением минимальных побочных эффектов антибактериальных средств, влияющих на уменьшение численности штаммов бактерий, устойчивых к лекарственным препаратам, особенно тех, которые входят в состав микробиома человека, в том числе стафилококков.

Материалы и методы. Спиртовой и водный экстракты растения *Zygophyllum coccineum* применяли против устойчивых к лекарственным препаратам штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных у пациентов больниц и частных клиник. Эти экстракты использовали в качестве антимикробных средств и ингибиторов формирования биопленок. Исследованию подлежала антибактериальная и антибиопленочная активность водных и спиртовых экстрактов растения.

Результаты. Изоляты *Staphylococcus aureus* проявляли устойчивость к антибиотикам (азитромицину, эритромицину, доксициклину, тетрациклину, ципрофлоксацину, цефокситину и пенициллину) с показателями 60%, 55%, 45%, 50%, 45%, 55% и 100% соответственно. Концентрация спиртового экстракта в 200 и 100 мкг/мл (мг/л) оказалась более эффективной в отношении влияния на бактериальные изоляты, чем водный экстракт в концентрации 200 мкг/мл (мг/л). Установлено, что при концентрации экстракта 50 мкг/мл происходило достоверное подавление формирования биопленки (до 77,7%).

Заключение. Спиртовой экстракт *Zygophyllum coccineum* проявлял более высокую эффективность в отношении микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью; к тому же он был более эффективен в отношении ингибирования формирования биопленок.

Ключевые слова: *Zygophyllum coccineum*, устойчивость к лекарственным препаратам, формирование биопленки, *Staphylococcus aureus*, спиртовой экстракт



■ INTRODUCTION

Multidrug-resistant (MDR) infections are infections caused by microorganisms, especially bacteria, that have developed resistance to many antibiotics, making them difficult to treat. Their appearance has recently increased in population centers. This resistance often emerges from the overuse or misuse of antibiotics, and it's a major global public health concern. These bacteria have significantly reduced the effectiveness of antibiotics, increasing the rate of treatment failure and mortality [1, 2]. Every year, an estimated 25,000 patients in Europe pass away from infections caused by bacteria that are resistant to drugs [3]. A 2014 WHO report indicated that the high resistance of bacteria to third-generation antibiotics, especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), in hospitals is more than 50% [4]. Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* was designated as a priority bacterium with a high resistance rate by the WHO in 2018[5]. The paper also pointed out that certain resistant bacterial strains are receiving special attention because of their capacity to quickly become resistant to several antibiotic classes, which restricts the range of treatment choices accessible[6]. Given these facts, researchers are working to find substitute techniques that might be used as novel antibacterial agents [7] proved that plant extracts have a significant effect on most pathogenic microorganisms. Nature has been a source of medicinal agents since ancient times, and plant extracts and natural products have been used as antimicrobials. Advanced plants represent a potential source for new antibiotic prototypes [8, 9]. A number of studies have shown that plants as well as products derived from them can possess antimicrobial activity and resistance-modulating effects [10, 11]. Therefore, with the increasing incidence of antibiotic resistance, natural products from plants may represent an interesting alternative. Virtually all pathogenic bacteria have been shown to rapidly acquire resistance to antimicrobial drugs, and multidrug-resistant bacteria have been a major cause of ineffectiveness in treating infectious diseases [12]. Therefore, to effectively combat resistant bacteria, various approaches must be researched and designed that are effective against pathogens and have minimal side effects on humans. One such strategy is to find suitable compounds of bioactive phytochemicals with antibacterial properties [13, 14]. Plants possess a wide diversity of secondary compounds that can be a potential source of many antimicrobial agents [15]. Plants possess a wide diversity of secondary compounds that can be a potential source of many antimicrobial agents [16]. Traditional medicine has long used the *Zygophyllum coccineum* plant to treat many ailments prevalent in popular societies, such as rheumatism, coughs, asthma, gout, flatulent colic, high blood pressure, and diuresis. The juice of the fresh leaves and stems of the plant itself is also used as an abrasive cleanser and to treat many skin diseases. It is also used as a worm expeller, antidiabetic, antipyretic, and local anesthetic [17, 18]. Numerous investigations have shown that *Zygophyllum coccineum* significantly lowers blood pressure in both normotensive and spontaneously hypertensive rats, including in vivo experiments. In an experimental model of rats, the effects of an aqueous extract of *Zygophyllum coccineum* on the mesenteric vascular bed and rat blood pressure were also discovered. *Zygophyllum coccineum* extract's dose-dependent ability to reduce heart rate and blood pressure in rats with normotension and spontaneous hypertension [19]. Many studies have proven the effect of biofilm on the development of bacteria resistance to treatments. It also has a major role in adhesion to living and non-living surfaces, thus giving bacteria the strength to do so [20]. The current study included the use

of the extract of the plant *Zygophyllum coccineum* and its testing on bacteria to determine its therapeutic effect and its effect on the formation of biofilms.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To use plant extracts as safe antibiotics with few side effects to reduce this type of strains, especially those that are part of the medical microbiome of humans, such as *Staphylococcus*.

■ MATERIALS AND METHODS

Collection of plant

Plant collection from the Samawah desert, located in southern Iraq. The external parts of the plant were washed with fresh double distilled water (DDW) to remove dust and other residues.

Preparation of alcohol extract of the plant

The alcohol extract was made using the technique described by Naji et al. [17] Powder of the aerial parts of plants (50 gm) was macerated in the 250 ml with 80% ethanol with a stirrer by a magnetic bar for 24 hours at room temperature and using filter paper to filter.

Preparation of watery extract

According to the method of El-Shora et [18], the aqueous extract was prepared. The external parts of the plant were washed several times with double distilled water and dried at 60 °C for 48 hours and then ground into a fine powder by a grinder. About 50 grams of the ground homogeneous material was placed in 250 ml of pure distilled water and then left on an orbital shaker for 24 hours at room temperature (23–28 °C) for extraction.

Pathogenic bacteria species used in this study

Staphylococcus aureus, the causative organism of various clinical diseases, was collected from patients suffering from urinary tract infections, wound infections, and skin infections from hospitals in Nasiriyah city. The isolates were identified according to international methods, including Gram staining, mannitol agar, novobiocin sensitivity test, catalase and coagulase test and cultured in each media that are specific to the matching bacterial [21].

Plant extracts activity assay

Bacterial suspensions were prepared and adjusted according to McFarland 0.5 standard and inoculated into pre-prepared Mueller-Hinton agar plates. Wells (5 mm) diameter, were punched into the agar using a sterile cork piercer. Each well was filled with 50 µL of different concentrations of plant extract (e.g., 25, 50, 100, 200 mg/ml). Inhibition zones were measured in millimeters after plates were incubated for twenty-four hours at 37 °C.

Determining a plant extract's minimal inhibitory concentrations (MIC)

The extract's lowest inhibitory concentration (MIC). The method of broth microdilution was employed to confirm the extract of *Zygophyllum coccineum*. A series of dilutions were prepared starting from a concentration of 200 mg/ml of the plant extract [22]. A 96-well micro titer plate containing 100 µl of sterile broth Mueller-Hinton was added to



each well in a microtiter plate. 100 microns of the 200-concentration extract were added to the first well, and 100 microns were transferred from the first well to the second well. A series of dilutions were performed to reach a concentration of 25 mg/ml. Each sample was duplicated. Each well was inoculated with a previously prepared bacterial suspension, which adjusted to 0.5 McFarland standards ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/ml), four wells were used as positive controls, inoculating the bacteria with MHB, and the other four wells were used as negative controls, leaving the wells containing only MHB. For 18 to 24 hours, the plates were incubated at 37 °C. The color change from blue to pink indicates bacterial metabolic activity, meaning that the bacteria are unaffected by the treatment [23].

Detection of biofilm formation

The microtiter plate detection method is a quantitative approach for evaluating biofilm formation using a microplate reader according to [24, 25]. In Mueller-Hinton broth supplemented with 1% glucose, A bacterial suspension was prepared, and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standards (approximately 1.5×10^8 CFU/ml). Subsequently, 180 μ l of MHB with 1% glucose was added to each well of a sterile, flat-bottomed 96-well microtiter plate, followed by 20 μ l of the bacterial suspension. A negative control well containing only broth (without bacteria) was also included. The plates were placed at 37 °C for 24 hours. The wells were then washed three times with pure D.W. solution to remove non-adherent cells, and the plate was air-dried. 200 μ L of 0.1% crystal violet solution was then added to each well and incubated for 15 minutes. Excess stain was removed, and the plate was washed again, dried at 37 °C for 30 minutes to ensure they wholly dry. Finally, the dye was resolubilized by added 200 μ l of acetic acid glacial mixed with absolute ethanol (1 : 1) for 10 min. The absorbance of optical density (OD) of each well was measured using a microplate reader. The optical density measured using a BioTek micro-plate reader (Agilent). Isolates were categorized into four classes. Based on the percentage of biofilm biomass, the biofilm level was classified as strong, medium, and weak, according to previous work by Stepanovich [26].

Statistical analysis

This data was statistically analysed by SPSS version 26, based in using one way ANOVA, LSD, and independent sample t test at $p < 0.05$ [27].

■ RESULTS

Antibiotic susceptibility test

The bacterial isolates were tested for susceptibility to nine commonly used antibiotics, selected for use in susceptibility testing of bacteria staphylococcus aureus.

Antibiotics susceptibility for staphylococcus aureus Isolates

The current study showed that staphylococcus aureus isolates were resistant to antibiotics (AZM, E, DO, T, CIP, FOX, and P) with percentages of 60%, 55%, 45%, 50%, 45%, 55%, and 100% respectively, whereas, the isolates were sensitive to (GEN and NOR) with percentages of 50% and 45% respectively.

The current study's findings demonstrated that the highest inhibitory zone of alcohol extract against Staphylococcus aureus was observed at a 200 μ g/ml (mg/l) concentration. with a mean of 17.15 ± 4.11 . Furthermore, the findings showed significant differences in

Table 1
The susceptibility of bacterial isolates to antibiotics in accordance with CLSI 2024

Antibiotic	Susceptibility					
	Sensitive		Intermediate		Resistance	
	No	%	No	%	No	%
GEN	10	50	2	10	8	40
AZM	7	35	1	5	12	60
E	5	25	4	20	11	55
DO	8	40	3	15	9	45
T	5	25	5	25	10	50
CIP	7	35	4	20	9	45
FOX	9	45	0	0	11	55
P	0	0	0	0	20	100
NOR	9	45	3.00	15	8	40
CalX2=31.82; P<0.01*						

Table 2
Activity of alcoholic extract against isolated bacteria (staphylococcus aureus)

S. aureus	Alcoholic extract inhibition zone / mm	p<0.01 LSD=1.65
	Mean±SD	
25%	6.73±3.67	
50%	9.40±5.2	
100%	15.93±2.82	
200%	17.15±4.11	

Table 3
Activity of aqueous extract against isolated bacteria (staphylococcus aureus)

S. aureus	Aqueous extract inhibition zone / mm	p<0.01 LSD=1.36
	Mean±SD	
25%	4.56±2.5	
50%	5.06±2.81	
100%	7.26±4.31	
200%	9.18±5.01	

the bacterial isolates’ growth repression mechanism according to extract concentrations at p<0.05, as seen in Table 2.

Activity of plant extracts against bacterial isolates
The activity of aqueous extract on staphylococcus spp.

The results of the current study showed the uppermost inhibition zone of aqueous extract was record at a concentration of 200 µg/ml (mg/l) against staphylococcus aureus. with a mean of 9.18±5.00. The results also showed significant differences at p<0.05 for the growth inhibition process of staphylococcus aureus depending on the concentrations of the extract as shown in Table 3.



Table 4
Inhibitory effectiveness of plant extracts and GEN

S. aureus	Alcoholic extract inhibition zone / mm	p-value
	Mean±SD	
Alcoholic 100%	17.15±4.11	<0.01
Alcoholic 200%	15.93±2.82	<0.01
Gentamycin	13.95±5.45	Compared with Gentamycin

Comparison of the inhibitory effectiveness between plant extracts and the most effective antibiotic

When comparing the efficacy of the highest inhibitory concentrations of plant extracts used in the current study with the most effective antibiotic (GEN) against the most antibiotic-resistant isolates of staphylococcus spp., the results showed that there was a significant increase for alcoholic extracts at concentrations of 200% and 100% µg/ml (mg/l) with a mean of 17.15±4.11 and 15.93±2.82 respectively, with statistically significant differences at $p<0.05$ between the efficacy of the antibiotic and the plant extracts, as shown in Table 4.

Evaluation of the anti-quorum sensing activity of the plant extracts Biofilm formation ability Staphylococcus spp.

The table 5 demonstrates the classification of Staphylococcus spp. isolates based on their ability to form biofilms, grouped into four categories: strong, moderate, weak, and non-biofilm formers. The classification was determined according to the mean values of the three replicate readings for each isolate.

- Strong biofilm formers (5 isolates) showed the highest mean value of 0.41 ± 0.02 , with a maximum biofilm formation value of 0.44, recorded by isolates Sa68 and B11.
- Moderate biofilm formers (4 isolates) had a mean value of 0.28 ± 0.05 , with values ranging from 0.21 to 0.33.
- Weak biofilm formers (9 isolates) displayed lower biofilm formation with a mean of 0.12 ± 0.02 , and values ranging from 0.10 to 0.18.
- Non-biofilm formers (2 isolates) showed the least formation with a mean of 0.07 ± 0.03 and values between 0.05 and 0.09.

"Statistical analysis using One-Way ANOVA revealed a highly significant difference ($p<0.001$) between the groups". The LSD (Least Significant Difference) value was 0.21,

Table 5
Biofilm formation ability staphylococcus spp.

Biofilm formation value	No.	Mean	Minimum	Maximum
Strong	5	0.41 ± 0.02	0.392	0.44 Sa68 / B11
Moderate	4	0.28 ± 0.05	0.21	0.33
Weak	9	0.12 ± 0.02	0.1	0.18
Non	2	0.07 ± 0.03	0.05	0.09
Anova sig.		<0.001 LSD 0.21		

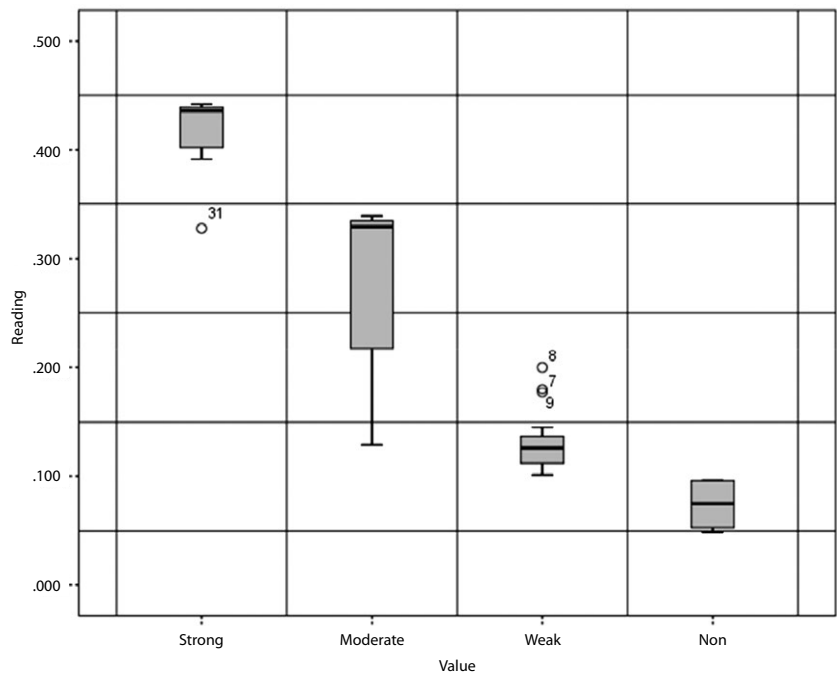


Fig. 1. Biofilm formation ability staphylococcus aureus

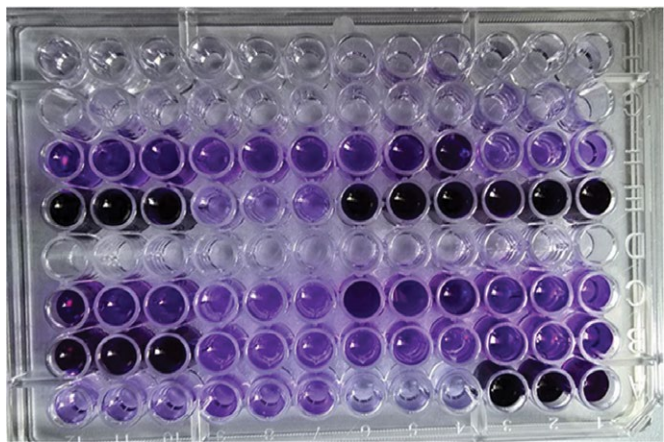


Fig. 2. Biofilm formation ability staphylococcus aureus

indicating that any mean difference equal to or greater than 0.21 between groups is statistically significant at $p=0.05$.

These findings confirm that most *Staphylococcus* spp. isolates in this study were capable of forming biofilms to varying degrees, with isolate B11 being the strongest biofilm producer.



■ DISCUSSION

The results of the current study indicate that there is a significant increase in the resistance of staphylococcal bacteria to commonly used antibiotics, which include: 100% resistance to penicillin more studies mention this percentage such as [28–30] the reason for the high resistance is attributed to the bacteria possessing beta-lactamase enzymes that degrade the penicillin group, whose genes are either chromosomal or plasmid in origin. These bacteria also produce proteins that bind penicillin [31]. staphylococcus aureus resistance to AZM and E with percentages of 60 and 55 respectively, this is consistent with the study by [32], It was also agreed with the study by [33] that this antibiotic had the highest levels of resistance. The rate of staphylococcus aureus resistance to FOX ranges from 55%, which is consistent with many local and international studies [34–36]. The increasing rate of staphylococcus aureus resistance to the antibiotic cefoxitin may indicate the spread of methicillin-resistant strains. The current study showed that staphylococcus aureus were 45% resistant to doxycycline and ciprofloxacin These ratios are close to the resistance ratio with the study by [37], also study by [38–40] and [28] explain high resistance staphylococcus aureus to tetracycline, which ratios are consistent with our current stud was its percentage 50%. staphylococcus aureus less resistance to gentamicin and norfloxacin reached to 40%, this is consistent with a study [28]. Norfloxacin was similar to the study [41], but the study differed in the percentage of resistance to gentamine, which was 100%. The similarity and difference in the rates of resistance to antibiotics may be attributed to several reasons, including the type of infection and its source, the environment from which the sample was isolated, and excessive use of certain types of treatments. For the current study explain the activity of alcoholic extract for the *Zygophyllum coccinium* plant against isolates staphylococcus aureus. It was found that there was a significant difference between the use of different concentrations of the extract in forming the diameter of the inhibition zone, as it ranged from the highest mean concentration, which reached 17.15 mm, to the lowest concentration, which reached 6.73. The study also showed a significant difference compared to the effect of the aqueous extract of the plant, as the concentration in the aqueous extract reached 9.18. This is consistent with many studies such as [22, 42], that show that the alcoholic extract has a significant effect due to its dissolving of chemical compounds of a greater type and concentration.

Since the results of the antibiotic sensitivity test recorded the highest percentage for gentamycin, this antibiotic was used as an element to monitor the effect of the plant extract, as shown in the table 4 When comparing the efficacy of the highest inhibitory concentrations of plant extracts used in the current study with the most effective antibiotic gentamicin against the most antibiotic-resistant isolates of staphylococcus aureus., the results showed that there was a significant increase for alcoholic extracts at concentrations of 200% and 100% mg/ml with a mean of 17.15 ± 4.11 and 15.93 ± 2.82 respectively, with statistically significant differences at $P < 0.05$ between the efficacy of the antibiotic and the plant extracts this result This result indicates that the effect of the extract on bacteria is stronger than that of the antibiotic gentamicin. [22] showed that the effect of the plant extract at a concentration of 100 mg/ml staphylococci was 7.5 ± 2.82 and gentamicin 21.5 ± 1.41 , which used n-hexane as a solvent. Table 5 shows that 18 samples of *Staphylococcus aureus* isolates were biofilm-producing, representing 90% of the total. This result is consistent with the results of the studies by [43, 44]. the classification of

Staphylococcus spp. isolates based on their ability to form biofilms, strong biofilm formers 25%, moderate 20%, weak 45% and non-former 10% These results are comparable to what was reached by [29]. These isolates produced biofilm when treated with inhibitory and sub-inhibitory concentrations, it was noted that there was a significant difference in terms of productivity, as the percentage reached 22% at 50 µg/ml alcoholic concentration and 77.7% at 25 µg/ml alcoholic concentration, which indicates the effect of the alcoholic extract on inhibiting biofilm formation, this is consistent with the study of [45], also who used the inhibitory concentration of the plant alcoholic extract. There are many studies on other bacteria, such as [46–48] that dealt with the effect of plant extract on the formation of biofilm, it was found that it can affect the formation biofilm without affecting the growth of bacteria, which makes bacteria less virulent in its absence.

■ CONCLUSION

The alcoholic extract of the *Zygophyllum coccineum* is more effective in terms of its effect on bacteria of multi drug-resistant and also, in the formation of biofilms.

■ REFERENCES

1. Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current opinion in microbiology*. 2009;12(5):476–81.
2. Kovač J, Šimunović K, Wu Z, et al. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)-α-pinene in *Campylobacter jejuni*. *PloS one*. 2015;10(4):e0122871.
3. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, et al. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*. 2024;2:100081.
4. WHO. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance Geneva. 2014. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/188783/9789241549400_eng.pdf
5. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*. 2018;32(1):76–7.
6. Hamim SS. Molecular characterization of mecA gene in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2016;6(1):25–9.
7. Chukwu EE, Awoderu OB, Enwuru CA, et al. High prevalence of resistance to third-generation cephalosporins detected among clinical isolates from sentinel healthcare facilities in Lagos, Nigeria. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2022;11(1):134.
8. Bhardwaj N, Puri S, Kumari A, et al. Investigation on antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and neuropsychiatry potential of phyto-mediated ZnONPs using *Colebrookea oppositifolia*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024;97:105748.
9. Abogo JM, Obiang CS, Begouabe H, et al. Evaluation of the efficacy of medicinal plants based on immunological biomarkers in the treatment of bacterial infections: Current status and future directions. *Gene Reports*. 2024:102052.
10. Zack KM, Sorenson T, Joshi SG. Types and mechanisms of Efflux Pump Systems and the potential of Efflux Pump Inhibitors in the restoration of Antimicrobial susceptibility, with a special reference to *Acinetobacter baumannii*. *Pathogens*. 2024;13(3):197.
11. Seukep JA, Sandjo LP, Ngadjui BT, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts and compounds from *Uapaca togoensis* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. *South African Journal of Botany*. 2016;103:1–5.
12. Surya Prakash DV, Gupta I, Singhal S, Pal D, Munawar TM. Antibiotic Resistance in Pathogens – a Global Concern. *Chemical Biology series (ebook collection)*. 2023:150-174.
13. Farah N, Bughlani MS, Riaz A, et al. Bactericidal Activities of Selected Medical Plants Against Multi-drug Resistance Uropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Applied Ecology and Environment Research*. 2025;23(2):2411–23. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/2302_24112423
14. Bhatia P, Sharma A, George AJ, et al. Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. *Heliyon*. 2021;7(2):e06310.
15. Domingues N, Ramos LD, Pereira LM, et al. Antimicrobial action of four herbal plants over mixed-species biofilms of *Candida albicans* with four different microorganisms. *Australian Endodontic Journal*. 2023;49(2):262–71.
16. Idris FN, Nadzir MM. Multi-drug resistant ESKAPE pathogens and the uses of plants as their antimicrobial agents. *Archives of microbiology*. 2023;205(4):115.
17. Naji WA, Enaya SH, Malih HR. Studying the Effect of Flavonoids Extracted from *Haloxylon salicornium* and *Zygophyllum coccineum* Plants on Burn Healing in Diabetic White Rabbits. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2023;90(1):1542–57.
18. Abd El Raheim M, Alam A, Nour YS, Radwan AM. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant activities of *Matricaria recutita*, *Ricinus communis* and *Zygophyllum coccineum* Extracts. *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci*. 2016;5:30–3.
19. Mohammedi Z. Phytochemical, antidiabetic and therapeutic properties of *Zygophyllum*. *Herbal Medicines Journal (Herb Med J)*. 2020;5(4):163–177.
20. Prinzi A, Rohde R. The role of bacterial biofilms in antimicrobial resistance. *American Society for Microbiology*. 2023:1705814.
21. Sana S, et al. Fundamentals of Microbiology: A Laboratory Manual. 2023. Scintific Knowledge Publisher. <https://www.sciknowpub.com/project-admin/published-book/SciKnowPub-701.pdf>
22. Jouda MM, Elbashiti T, Masad A, Albayoumi M. The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotics. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016;5(2):23–33.



23. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321–4.
24. Bajlan JS, Al-Mathkhury HJ, Imran SG. Biofilm development capacity and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients in Baghdad, Iraq. *Biochemical & Cellular Archives*. 2022;22(1):1–6.
25. Elawady R, Aboulela AG, Gaballah A, et al. Antimicrobial Sub-MIC induces *Staphylococcus aureus* biofilm formation without affecting the bacterial count. *BMC infectious diseases*. 2024;24(1):1065.
26. Stepanović S, Vuković D, Hla V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007;115(8):891–9.
27. Okab HF, Salih MB, Jarulla BA. Evaluation of CXCL 10 and IL-10 in COVID-19 pneumonia. 2024;71(4):175–80.
28. Jafa NN. Isolation and identification of some bacteria that causes inflammation of otitis media in Thi-Qar. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2013;3(4):1–5.
29. Jabur EQ, Kandala N. The Production of Biofilm from Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Post-Surgical Operation Inflammation. *Iraqi Journal of Science*. 2022;3688–702.
30. Akinduti PA, Emoh-Robinson V, Obamoh-Triumphant HF, et al. Antibacterial activities of plant leaf extracts against multi-antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* associated with skin and soft tissue infections. *BMC complementary medicine and therapies*. 2022;22(1):47.
31. Egorov AM, Ulyashova MM, Rubtsova MY. Bacterial enzymes and antibiotic resistance. *Acta Naturae*. 2018;10(4 (39)):33–48.
32. Navidifar T, Zare Banadkouki A, Parvizi E, et al. Global prevalence of macrolide-resistant *Staphylococcus spp.*: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*. 2025;16:1524452.
33. Jafar Alwash S, Abed Aburesha R. The Differences in Antibiotic-resistance among Several *Staphylococcus aureus* strains in Iraq. *Medico-legal Update*. 2021;21(3):476–485.
34. Muhammad H, Al-Mathkhury H. The Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* in AL-Sulaimania city. *Iraqi Journal of Science*. 2014;55(2A):386–93.
35. Azzam A, Khaled H, Mosa M, et al. Epidemiology of clinically isolated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and its susceptibility to linezolid and vancomycin in Egypt: a systematic review with meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 2023;23(1):263.
36. Ellis RJ, Brajicich BC, Bertens KA, et al. Association between biliary pathogens, surgical site infection, and pancreatic fistula: results of a randomized trial of perioperative antibiotic prophylaxis in patients undergoing pancreatoduodenectomy. *Annals of surgery*. 2023;278(3):310–9.
37. An NV, Hai LH, Luong VH, et al. Antimicrobial resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated at a general hospital in Vietnam between 2014 and 2021. *Infection and drug resistance*. 2024;259–73.
38. Hashem RA, Yassin AS, Zedan HH, Amin MA. Fluoroquinolone resistant mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Cairo, Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;7(11):796–803.
39. Deyno S, Fekadu S, Astatkie A. Resistance of *Staphylococcus aureus* to antimicrobial agents in Ethiopia: a meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017;6:1–5.
40. Hashim IA, Wdaah QH, Atya AA. Potential effect of antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with skin infections. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2019;7(1):7–14.
41. Shemetov O, Faustova M, Perepelova T, et al. Forecasting the development of antimicrobial resistance of *S. aureus*. *Frontiers in Oral Health*. 2025;5:1514070.
42. Acharjee M, Zerín N, Ishma T, Mahmud MR. In-vitro anti-bacterial activity of medicinal plants against Urinary Tract Infection (UTI) causing bacteria along with their synergistic effects with commercially available antibiotics. *New Microbes and New Infections*. 2023;51:101076.
43. Kadhim MJ, Saadeen SM. Anti-biofilm activity of *Cynanchum acutum* leaves extract and assessing their effect against the virulence gene SEG of *Staphylococcus aureus* bacteria. *Romanian Journal of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases*. 2024;31(1):246–57.
44. Khadam AA, Salman JA. Antibacterial and Antibiofilm of Purified β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* against Wound Infections Causative Bacteria. *Iraqi Journal of Science*. 2024:2397–409.
45. Gomes F, Martins N, Ferreira IC, Henriques M. Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Heliyon*. 2019;5(5):1–4.
46. Wijekoon MJ, Bhat R, Karim AA. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etligeria elatior* Jack.) inflorescence. *Journal of food composition and analysis*. 2011;24(4–5):615–9.
47. Kalia M, Yadav VK, Singh PK, et al. Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one*. 2015;10(8):e0135495.
48. Alam K, Al Farraj DA, Mah-e-Fatima S, et al. Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Infection and Public Health*. 2020;13(11):1734–41.



Nhrawaan Mohammed Wali¹✉, Alyaa Hussein Talib², Huda Jihad G. Al-Shastri¹

¹ College of Pharmacy, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq

² College of Education for Pure Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq

Antibacterial Activity of Ethanolic and Aqueous Extracts of *Chlorella Vulgaris* Against Pathogenic Bacteria Isolated from Patients with Diarrhea

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Nhrawaan Mohammed Wali – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, visualization, writing – original draft and editing; Alyaa Hussein Talib – conceptualization, data curation, investigation, software, supervision, writing – original draft and editing; Huda Jihad G. Al-Shastri – conceptualization, data curation, investigation, methodology, supervision, validation, visualization, writing – original draft and editing. The article is published in author's edition.

Submitted: 11.10.2024

Accepted: 29.05.2025

Contacts: medicalresearch64@yahoo.com

Abstract

Introduction. The therapeutic implications of *Chlorella's* inherent antioxidants are powerful in several disorders. Nevertheless, the antimicrobial efficacy and the specific mechanism by which they function at a molecular level have not yet been examined.

Purpose. Evaluation of the activity of both ethanolic and aqueous *C. vulgaris* extract against pathogenic bacteria isolated from patients with diarrhea and compare the activity with commercial antibiotics.

Materials and methods. The present study was involved 100 stool samples from patients with diarrhea, and identification the most isolated bacteria. The algal extract was prepared in four different concentrations in both ethanolic and aqueous extract and identified the bio-active compound.

Results. The results of the current study were recorded that the most isolated bacteria were multi-drug resistant bacteria, also, showed the *P. aeruginosa* the most resistant bacteria for both antibiotics and algal extract. In addition, the ethanolic extract has high anti-bacterial activity than aqueous extract. Furthermore, the ethanolic extract had five bio-active compounds, while the aqueous extract has only three active compounds. The sensitivity of isolated bacteria (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) to eleven antibiotics, as well as the inhibitory activity of extracts at different concentrations was established.

Conclusion. The study determined that the ethanolic extract is more potent as an antibacterial agent compared to the aqueous extract. Additionally, the activity of both extracts was found to rise as the concentration increased.

Keywords: *C. vulgaris*, algal extract, antibiotics susceptibility, pathogenic bacteria, diarrheal patients



Нраван Мохаммед Вали¹✉, Алья Хусейн Талиб², Худа Джихад Г. Аль-Шастри¹

¹ Фармацевтический колледж, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, Ирак

² Педагогический колледж естественных наук, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, Ирак

Антибактериальная активность спиртового и водного экстрактов *Chlorella vulgaris* в отношении патогенных бактерий, выделенных у пациентов с диареей

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Нраван Мохаммед Вали – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Алья Хусейн Талиб – концепция, научное руководство, обработка данных, проведение исследований, программное обеспечение, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование; Худа Джихад Г. Аль-Шастри – концепция, научное руководство, обработка данных, проведение исследований, методология, проверка подлинности полученных данных, визуализация, написание чернового варианта статьи, редактирование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 11.10.2024

Принята: 29.05.2025

Контакты: medicalresearch64@yahoo.com

Резюме

Введение. Благодаря входящим в состав хлореллы антиоксидантам она обладает значительным терапевтическим потенциалом при лечении ряда заболеваний. Тем не менее антимикробная эффективность и конкретный механизм действия этих антиоксидантов на молекулярном уровне пока не изучены.

Цель. Оценить действие спиртового и водного экстрактов *C. vulgaris* на патогенные бактерии, выделенные у пациентов с диареей, и сравнить его с действием коммерческих антибиотиков.

Материалы и методы. В настоящем исследовании было использовано 100 образцов кала пациентов с диареей для идентификации наиболее часто выделяемых бактерий. Готовили спиртовой и водный экстракты водорослей в четырех различных концентрациях и определяли содержащиеся в них биологически активные соединения.

Результаты. Результаты исследования показали, что наиболее часто выделяемыми с калом бактериями были бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, а *P. aeruginosa* демонстрировала наибольшую устойчивость к антибиотикам и к экстракту водорослей. Установлено, что спиртовой экстракт обладает более высокой антибактериальной активностью, чем водный. Более того, в спиртовом экстракте выявлено пять биологически активных соединений, в то время как водный экстракт содержал только три активных соединения. Установлена чувствительность изолированных бактерий (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*) к одиннадцати антибиотикам, а также ингибиторная активность к экстрактам разных концентраций.

Заключение. Исследование показало, что спиртовой экстракт растения *Chlorella vulgaris* обладает более выраженным антибактериальным действием, чем водный экстракт. Кроме того, было установлено, что активность обоих экстрактов увеличивается при повышении их концентрации.

Ключевые слова: *C. vulgaris*, экстракт водорослей, чувствительность к антибиотикам, патогенные бактерии, пациенты с диареей

■ INTRODUCTION

Microalgae are a collection of single-celled or basic multi-celled microorganisms that can perform photosynthesis. They have been studied for their bioactive compounds, and their external products also show potential uses in fighting against bacteria, viruses, fungi, algae, protozoa, and malaria parasites [1]. These individuals are separated into four distinct categories: red, green, brown, and blue green. The photosynthetic performance of this taxonomic group is quite high, even though it is not classified under the Plant kingdom but rather within the Protista kingdom. There is a possibility that algae have a high reproductive potential, and as a result, they can expand quite quickly. Humans may utilize microalgae in various sectors of daily life, including energy production, food production, fertilizer production, nutraceuticals, cosmetics, pharmaceuticals, aquaculture, and pollution control, to create a promising future for future generations. Advancements in algae therapeutic research have enabled the discovery of bioactive chemicals that are highly efficient against a wide range of diseases [2, 3]. Microalgae have significant potential in the production of bioactive substances that are obtained from algae and have been demonstrated to be more effective and beneficial compared to typical treatment methods [4]. Fatty acids derived from *Colatrella* spp. and *Rhodella violacea* were discovered to exhibit activity against human infections such as *S. aureus* and *S. pyogene* [5]. Microalgae biomass generation has extensive applications in aquaculture, biotechnology, and food science, among other fields. Microalgae exhibit variations in their chemical composition mostly due to changes in the growth conditions [6]. The preceding papers examined the effects of nitrogen shortage on the growth, nutrient uptake, and chemical composition of two species, namely *Chlorella* spp. and *Nannochloropsis oculata* [7].

The antibacterial compound known as 'chlorellin' was initially extracted from *Chlorella*. The fatty acid combination shown inhibitory efficacy against both Gram-positive and Gram-negative bacteria [8]. Microalgae were not previously considered for medicinal uses as their exploration just began after the 1950s. Extensive research is currently being conducted to discover new therapeutic compounds that can effectively cure infectious diseases due to their ability to produce a broad spectrum of antibiotics [9]. Given the emergence of infectious diseases, viral infections, and the increase in antibiotic-resistant bacteria, there is a pressing need to discover new treatment methods for infectious disorders [10]. Moreover, further research is required to discover the specific chemicals that are directly accountable for the emerging antimicrobial properties. The initial antibacterial molecule derived from *Chlorella* sp. is a combination of fatty acids, which has been discovered to be the cause of the inhibitory effect on both gram positive and gram-negative bacteria. Photosynthesis is widely known to capture anthropogenic CO₂, and algae have been identified as fast-growing organisms with better carbon fixation rates compared to terrestrial plants [11].

Continuous growing of algae has the potential to contribute to the bio fixation of CO₂ and generate valuable products from biomass, including proteins, fatty acids, vitamin A,



minerals, pigments, dietary supplements for humans, animals, aquaculture, and other bio-compounds [12]. Diatoms are recognized as the primary group responsible for primary production and carbon export in coastal regions. Dinoflagellates play a significant role in biomass in areas with stratification or limited silica. Cyanobacteria are the dominant group in offshore continental shelf and oceanic waters [13]. The chemical composition of microalgae can exhibit significant variations due to variances in the measurement methodologies employed [14]. The physiological condition of the microalgae is influenced by various factors, including temperature, light intensity, and culture media. These factors are particularly important in batch cultures. The development and accumulation of bioactive components are crucial when cultivating microalgae for the purpose of feeding marine creatures or producing specific useful chemicals [11, 15].

■ PURPOSE OF THE STUDY

Evaluation of the activity of both ethanolic and aqueous *C. vulgaris* extract against pathogenic bacteria isolated from patients with diarrhea and compare the activity with commercial antibiotics.

■ MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of bacteria

In Thi-Qar Province, a collection of 100 stool samples was obtained from individuals suffering from diarrhea. The age range of these patients was between 5 and 10 years, with 68 males and 32 females among the diarrhea cases. The bacteria utilized in this investigation were identified through cultivation on both standard culture media and EPI-20. The most prevalent bacteria isolated were *S. epidermis*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*, as reported by Forbes et al. [16].

Antibiotic sensitivity test

The isolated bacteria were tested against eleven different antibiotics for evaluation the antibiotics susceptibility of isolated bacteria.

Preparation of algae extract

A certain quantity of *Chlorella vulgaris* biomass was let to dry naturally at room temperature and subsequently crushed using a blender. The 5 g powder was placed in sterile tubes and extracted with various solvents, such as ethanol and water, using a rotary evaporator at a temperature of 40 °C for a duration of 12 hours. 5 mL of the solvent extracts were extracted individually, dried at room temperature, and then weighed to make an estimation. The desiccated extracts were fully dissolved in 5 ml of 0.5% Tween 80 and stored at a temperature of 5 °C in sealed screw cap bottles until they were ready to be used for the antibacterial experiments, as described by Dineshkumar et al. [17]. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was combined with double distilled water and used as the control for all the plates. The experiments were conducted in duplicate. The antibacterial activity was assessed using the disc diffusion method described by Kiehlbauch et al. [18]. The effectiveness of the microalgal extract was tested against gram-negative pathogens, namely *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, as well as certain positive bacteria like *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Evaluation of some active compounds in algae extract

The active compounds (Glycosides, Flavonoids, Alkaloids, Carbohydrates, Saponins, Phenols, and Terpenoids) were tested in both ethanolic and aqueous algal, and the method that followed for detection as mentioned in study of Bhuvana et al. [19].

Preparation of concentrations of algal extracts

The algal powder was immersed in a sufficient amount of 70% ethyl alcohol and water. The extraction process involved periodic agitation at ambient temperature for a duration of 3 days. Following filtration through Whatman No. 4 filter paper, the remaining substance was extracted two more times. The resulting extract was then evaporated under decreased pressure using a rotary evaporator and dried until a consistent weight was achieved. The residue was held at a temperature of 4 °C until it was ready to be used according to the procedure described by Williamson et al. [20]. After preparing the stock solution, four different concentrations were prepared: 25%, 50%, 75%, and 100%.

Studying the inhibitory activity of different concentrations of extracts

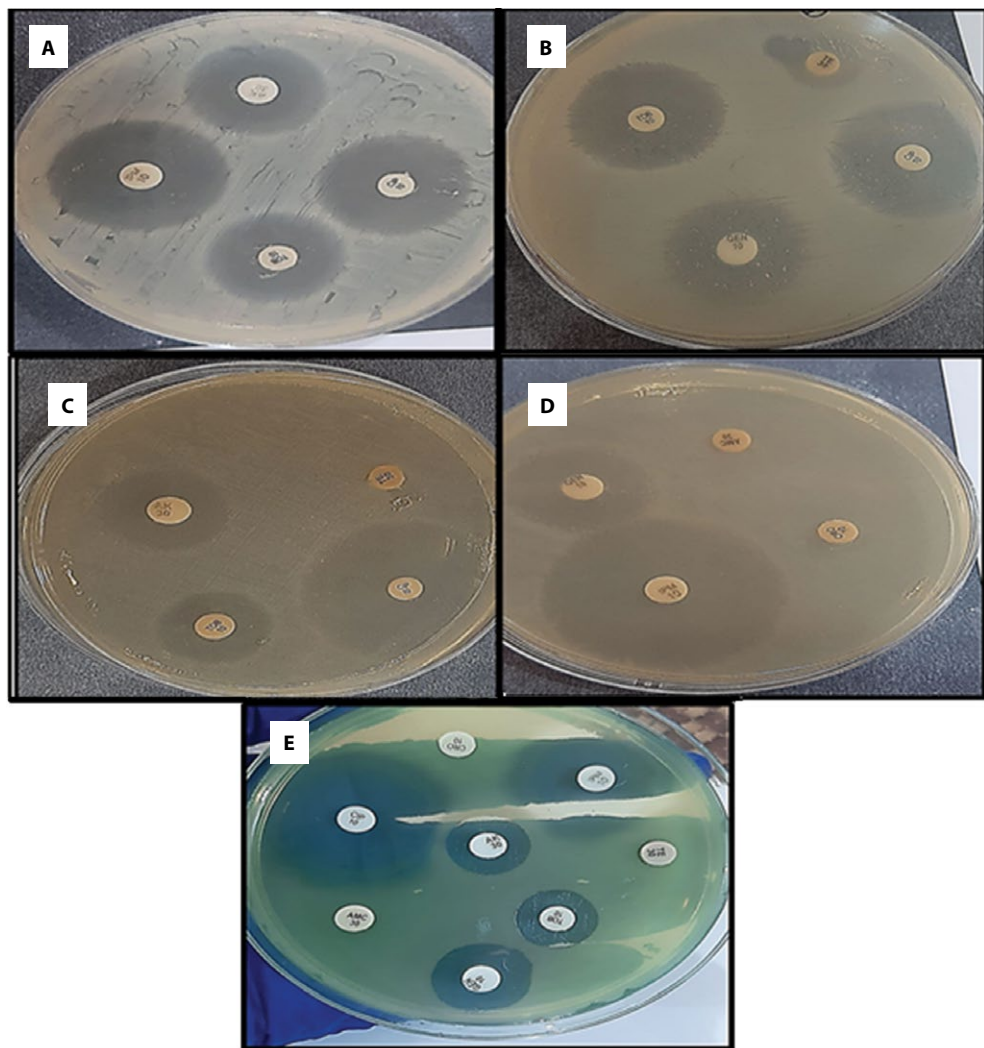
The diffusion method was followed on the bacterial agar, and four holes with 0.4 mm diameter were made on Müller-Hintén agar containing the growing bacteria. Using a sterile plastic diffuser, the algal extract was loaded with (12) microliters of the extract onto the culture medium. The plates were incubated at temperature (37). degrees Celsius for (24) hours, then the diameter of the damping zone was measured according to method of Williamson et al. [20].

RESULTS

A statistically significant difference ($p<0.001$) was seen in the response of isolated bacteria to different antibiotics. Specifically, *S. aureus* showed resistance to Cefotaxime, Amoxicillin-clavulanic acid, and Carbenicillin. The *K. pneumoniae* and *E. coli* exhibited resistance to Gentamicin, Cefotaxime, Amoxicillin-clavulanic acid, and Carbenicillin.

Table 1
Sensitivity of bacterial isolates to different types of antibiotics

Antibiotics	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Norfloxacin	20.4±2.33	18.9±3.22	23.4±2.48	19.6±2.11	17.8±1.88
Gentamicin	19.3±1.85	6.24±0.87	7.22±1.22	8.88±0.88	7.23±0.78
Ceftazidime	22.5±2.21	17.8±1.83	19.2±2.22	7.29±0.82	7.22±0.67
P-Ofloxacin	20.4±1.89	20.2±2.00	18.3±1.89	20.3±1.22	20.3±2.44
Cefotaxime	8.24±0.89	8.44±1.04	9.22±0.89	8.02±0.77	6.55±0.78
Cefepime	24.3±1.02	19.2±2.13	22.4±1.57	18.2±2.76	18.9±1.89
Tobramycin	22.3±2.04	15.2±2.05	8.22±3.02	21.6±2.67	14.3±2.11
Aztreonam	25.3±2.22	26.4±2.10	26.4±1.18	17.4±2.55	15.2±1.38
Amoxicillin clavulanic acid	8.89±0.24	7.22±0.88	5.22±0.55	6.01±0.88	5.22±0.98
Imipenem	28.2±1.67	28.4±1.67	18.4±1.23	18.7±2.77	13.2±2.01
Carbenicillin	9.88±1.02	7.01±1.11	7.33±0.67	6.33±0.67	4.88±0.89
p. value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LSD	0.87	0.72	0.67	0.69	0.92



Antibiotics susceptibility of isolated bacteria as following: A – *S. aureus*, B – *K. pneumonia*, C – *E. coli*, D – *P. mirabilis*, E – *P. aeruginosa*

Ultimately, both *P. mirabilis* and *P. aeruginosa* exhibited resistance to Gentamicin, Cefotaxime, Ceftazidime, Amoxicillin-clavulanic acid, and Carbenicillin.

Detection of active compound

The present investigation revealed that the ethanolic extract had five distinct families of active compounds, whereas the water extract contained only three types of active compounds. Additionally, it was observed that the ethanolic extract exhibited a high concentration of alkaloids and carbohydrates, whereas the aqueous extract had a modest amount of carbohydrates.

Table 2
Presence or absence of the active compounds in Chlorella vulgaris ethanolic extract by standard instructions

Class of compounds	Result	
	Ethanolic	Aqueous
Glycosides	++	+
Flavonoids	+	–
Alkaloids	+++	+
Carbohydrates	+++	++
Saponins	–	–
Phenols	+	–
Terpenoids	–	–

Activity of ethanolic extract against isolated pathogenic bacteria

The present results showed that a significant difference at p. value <0.05, between concentrations of extracts against all involved bacteria, also, the current study showed that the anti-bacterial activity had positive correlation with extract concentration. In addition, the most resistant bacteria were P. aeruginosa and S. aureus. Furthermore, the most susceptible bacteria to ethanolic extract were K. pneumonia, as in Table 3.

Activity of Aqueous Extract Against Isolated Pathogenic Bacteria

The present results showed that a significant difference at p. value <0.05, between concentrations of extracts against all involved bacteria, also, the current study showed that the anti-bacterial activity had positive correlation with extract concentration. In addition, the most resistant bacteria were P. aeruginosa, while the most susceptible bacteria E. coli. Furthermore, the aqueous extract not exhibited activity in 25%, 50%, and 75% against P. aeruginosa, as in Table 4.

Table 3
Effect of different concentrations of ethanolic extract of Chlorella vulgaris

Concentration	S. aureus	K. pneumoniae	E. coli	P. mirabilis	P. aeruginosa
25%	8.22±1.33	12.9±2.07	11.6±2.06	10.2±1.11	0.00±0.00
50%	14.2±2.67	14.6±0.67	15.4±2.43	13.7±1.66	8.22±179
75%	14.6±1.21	18.8±1.67	18.2±2.33	15.2±2.86	10.4±1.59
100%	18.8±1.59	22.2±2.60	23.3±2.89	18.4±2.69	14.7±2.66
p. value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LSD	1.02	1.18	1.45	1.25	1.36

Table 4
Effect of different concentrations of aqueous extract of Chlorella vulgaris

Concentration	S. aureus	K. pneumoniae	E. coli	P. mirabilis	P. aeruginosa
25%	0.00±0.00	0.00±0.00	4.22±0.67	0.00±0.00	0.00±0.00
50%	4.24±0.35	0.00±0.00	7.33±0.33	2.66±0.68	0.00±0.00
75%	5.27±0.87	8.67±1.53	12.7±2.22	4.29±0.42	0.00±0.00
100%	13.2±1.80	11.4±2.07	15.3±1.67	10.3±1.02	5.33±0.44
p. value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LSD	0.89	0.76	1.03	0.81	0.32



■ DISCUSSION

Medicinal algae are regarded as a valuable source of components that can be utilized in the creation and manufacture of drugs. The molecules discovered exhibit a wide range of diversity, with the majority falling under four prominent biochemical categories: alkaloids, glycosides, polyphenols, and terpenes. Certain types of algae are regarded as significant sources of nutrients, while others are recommended for their medicinal properties [21]. The alga's high concentration of chemical compounds with biological activities has facilitated research into its properties in medical, agricultural, and poultry fields. The chemical compounds from both algae were extracted using ethanol and aqueous solutions, purified, and utilized to demonstrate their medical significance and therapeutic potential, particularly in treating bacterial infections isolated from patients with diarrhea. The large number of secondary metabolites as photosynthetic pigments and auxiliary dyes, especially xanthophylls and carotenoids, as well as the phycocyanin pigment, which is due to most of the antioxidant properties that these algae possess [22]. As well as the nutritional value present in these algae that have been used recently as food and therapeutic additives in animal husbandry fields, especially poultry, also used as a food supplement in many countries because it contains 55–75% protein, 18% essential amino acids, 12–25% sugars, salts, minerals and vitamins [23]. Other causes that lead to use of *C. vulgaris* being non-toxic and easy to collect and handle algae compared to other types of green algae and blue-green algae. Numerous international and local studies have been confirmed the medicinal importance of algae species, especially *C. vulgaris* [24].

The current results showed that the ethanolic extract had five types of active chemical compounds, while the aqueous extract had only three types of compounds. In addition, the present study showed that the ethanolic extract had anti-bacterial activity more than aqueous extract in all concentrations, and against all isolated bacteria. Furthermore, the antibiotics that used for inhibited bacterial growth had range of inhibition zone (5–28 mm) then the ethanolic extract had range of inhibition zone (0–23 mm), while the aqueous extract had range of inhibition zone (0–15). This study investigated the ethanolic extract is more effective as anti-bacterial treatment. The study of Dineshkumar et al. [25], showed that the ethanol extract of *Chlorella* demonstrated inhibitory effects against different clinical isolates, including *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *B. subtilis*, at a concentration of 100 mg ml⁻¹, with varying zone size from 15 to 24 mm. these results agreed with current study was the range of ethanolic inhibition zone at 100% concentration ranging from 14–23. Also, the study of Das and Pradhan [26], recorded the crud ethanolic, methanolic, and aqueous extract have antibacterial activity against all bacteria with except *V. cholera*. This suggests that the bioactive compounds accountable for the observed activity are likely polar or semi-polar. These findings highlight the potential of *C. vulgaris* extracts and their fractions as sources of antibacterial agents for controlling and treating pathogenic bacteria.

Additional investigations can be carried out to isolate and identify the precise bioactive compounds responsible for the noted activity within these low-polarity fractions. The present study confirms that *C. vulgaris* possesses antibacterial properties, not only in its crude, but may be in individual organic fractions. Previous studies have indicated that the Chlorellin pigments found in the algae exhibit activity against certain bacteria, as per the findings in study of Pradhan et al. [27], and study of Pratt et al. [28]. In addition, the analysis of *Chlorella* sp. (UKM8) using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

highlighted the presence of major compounds such as phenol, phytol, hexadecenoic acid and heptane, which were found to possess antibacterial activity as recorded by Shaima et al. [29]. The antimicrobial activity of algal extracts was tested against several pathogenic bacteria.

The results of the study indicate that the ethanolic extract of *C. vulgaris* exhibited significant activity against pathogenic bacteria, with the aqueous extract of *C. vulgaris* showing a somewhat lower level of activity. Syed et al. [30] utilized ethanol solutions to extract *C. vulgaris* and evaluated the isolated compounds for their antimicrobial activity against pathogenic bacteria. The researchers found that the acetone extract showed the highest activity against *Bacillus* spp. and the lowest activity against *E. coli*. The ethanol extract, on the other hand, demonstrated maximum activity against *Klebsiella* spp. and the lowest activity against *Pseudomonas* spp. The remaining extracts exhibited their highest activity against *Bacillus* spp. and the lowest activity against *Klebsiella* spp. In a study conducted by Uma et al. [31], the antimicrobial activity of *C. vulgaris* was investigated using different solvents (acetone, methanol, ethanol, and DMSO) for extraction. The extracts were then tested against multi-drug resistant bacteria including *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp, *V. cholerae*, *S. pyogenes*, and *E. coli*. The study found that the extracts obtained with acetone, methanol, and ethanol were most effective against *Pseudomonas* spp., while the DMSO extract showed the highest activity against *K. pneumoniae*. Additionally, the study observed that *V. cholerae* had the lowest response to the extract activity.

The variation in the effectiveness of algal extracts against pathogenic bacteria can be attributed to the presence of active compounds in the extract, genetic differences among the isolated microbes, or the lipid content in the cell wall of gram-negative bacteria, which hinders the penetration of the active compound into the bacterial cell [32].

■ CONCLUSION

The present study was conducted that the isolated bacteria considered multi-drug resistant bacteria, and the ethanolic extract had nearly same activity of antibiotic effectiveness, while the aqueous extract had less anti-bacterial activity. In addition, the ethanolic extract had more than bio-active compounds compared to aqueous extract. Therefore, using the ethanolic extract in treatment bacterial infection is most safety than commercial antibiotics.

■ REFERENCES

1. Queiroz MI, Vieira JG, Maroneze MM. Morphophysiological, structural, and metabolic aspects of microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* 2020 Jan 1 (pp. 25–48). Academic Press.
2. Gao L, Li X, Kong F, et al. AlgaeNet: A deep-learning framework to detect floating green algae from optical and SAR imagery. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*. 2022 Mar 25;15:2782–96.
3. Udayan A, Pandey AK, Sharma P, et al. Emerging industrial applications of microalgae: challenges and future perspectives. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2021 Oct;1(4):411–31.
4. Balasubramaniam V, Gunasegavan RD, Mustar S, et al. Isolation of industrial important bioactive compounds from microalgae. *Molecules*. 2021 Feb 10;26(4):943.
5. Adegboye O, Field MA, Kupz A, et al. Natural-product-based solutions for tropical infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2021 Dec 15;34(4):e00348-20.
6. Ahmad A, W. Hassan S, Banat F. An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: Food security and circular economy. *Bioengineered*. 2022 Apr 1;13(4):9521–47.
7. Deviram G, Mathimani T, Anto S, et al. Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment. *Journal of Cleaner Production*. 2020 Apr 20;253:119770.



8. Elsalhin HE, Abobaker HM. Antibacterial study of *Chlorella vulgaris* isolated from fresh water. *EPH-International Journal of Applied Science*. 2019 Sep 27;5(3):23–7.
9. Borowitzka MA. Microalgae in medicine and human health: A historical perspective. In *Microalgae in health and disease prevention* 2018 Jan 1 (pp. 195–210). Academic Press.
10. Annamalai J, Nallamuthu T. Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of *Chlorella vulgaris* and their anti-pathogenic properties. *Applied Nanoscience*. 2015 Jun;5:603–7.
11. Shaima AF, Yasin NH, Ibrahim N, et al. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp.(UKM8) and *Scenedesmus* sp.(UKM9). *Saudi journal of biological sciences*. 2022 Feb 1;29(2):1043–52.
12. Shekh A, Sharma A, Schenk PM, et al. Microalgae cultivation: photobioreactors, CO₂ utilization, and value-added products of industrial importance. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2022 May;97(5):1064–85.
13. Abrantes F, Cermeno P, Lopes C, et al. Diatoms Si uptake capacity drives carbon export in coastal upwelling systems. *Biogeosciences*. 2016 Jul 18;13(14):4099–109.
14. Tibbetts SM, Milley JE, Lall SP. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*. 2015 Jun;27:1109–19.
15. Borowitzka MA. *Algal physiology and large-scale outdoor cultures of microalgae*. Springer International Publishing; 2016.
16. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2018 Apr;31(2):10–128.
17. Dineshkumar R, Rasheeq AA, Arumugam A, et al. Marine microalgal extracts on cultivable crops as a considerable bio-fertilizer: A Review. 2019.
18. Kiehlbauch JA, Hannett GE, Salfinger M, et al. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. *Journal of clinical microbiology*. 2000 Sep 1;38(9):3341–8.
19. Bhuvana P, Sangeetha P, Anuradha V, Ali MS. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. oculata* and *C. vulgaris*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019 May 1;19:101094.
20. Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*, Volume 1. John Wiley & Sons; 1996 Jul 10.
21. Sakha H, Hora R, Shrestha S, et al. Antimicrobial activity of ethanolic extract of medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*. 2018 Sep 26;5:1–6.
22. Ariede MB, Candido TM, Jacome AL, et al. Cosmetic attributes of algae-A review. *Algal research*. 2017 Jul 1;25:483–7.
23. Mobin SM, Chowdhury H, Alam F. Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications – A review. *Energy Procedia*. 2019 Feb 1;160:752–60.
24. Ghaeni M, Roomiani L. Review for application and medicine effects of *Spirulina*, microalgae. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. Vol. 2016 Jun;3(2).
25. Dineshkumar R, Narendran R, Jayasingam P, Sampathkumar P. Cultivation and chemical composition of microalgae *Chlorella vulgaris* and its antibacterial activity against human pathogens. *J Aquac Mar Biol*. 2017;5(3):00119.
26. Das BK, Pradhan J. Antibacterial properties of selected freshwater microalgae against pathogenic bacteria. *Indian Journal of Fisheries*. 2010 Apr 1;57(2):61–6.
27. Pradhan J, Das BK. Antibacterial activity of organic fractions from freshwater microalga *Chlorella vulgaris* against fish and shellfish pathogens: Antibacterial activity of *Chlorella* against fish pathogens. *Indian Journal of Fisheries*. 2024;71(2).
28. Pratt R, Daniels TC, Eiler JJ, et al. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. *Science*. 1944 Apr 28;99(2574):351–2.
29. Shaima AF, Yasin NH, Ibrahim N, et al. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp.(UKM9). *Saudi journal of biological sciences*. 2022 Feb 1;29(2):1043–52.
30. Syed S, Arasu A, Ponnuswamy I. The uses of *Chlorella vulgaris* as antimicrobial agent and as a diet: the presence of bio-active compounds which caters the vitamins, minerals in general. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*. 2015 Feb;7(1):185–90.
31. Uma R, Sivasubramanian V, Niranjali Devaraj S. Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae. *Desmococcus olivaceus*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *J Algal Biomass Utiln*. 2011;2(3):74–81.
32. Elshouny WA, El-Sheekh MM, Sabae SZ, et al. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* against aquatic bacterial isolates. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2017 Apr 1;6(5):1203.



Mortada Esam Sadiq, Muhsin S. AL Moziel, Asia S. Abdullah✉
Institute of Pharmacy, Basrah, Iraq

Impact of Hibiscus Extract Supplementation on Testicular Functions and Oxidative Stress in Rats Exposed to Chlorpyrifos

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of research, collecting material, processing, writing text – Mortada Esam Sadiq; the concept and design of research, editing, collecting material – Muhsin S. AL Moziel; the concept and design of research, editing – Asia S. Abdullah.

Ethics statement. The animals were handled according to ethical principles of international Ethical Guidance for Health-related research involving humans or animals prepared by the Council International Organization of Medical Science (CIOMC) in collaboration with World Health Organizations (WHO), and following the framework of the Office International des Epizootic (OIE) principals. Authorized by the University of Basra / College of Pharmacy in Approval number EC50 on 1/9/2023. The article is published in author's edition.

Submitted: 11.03.2025

Accepted: 23.09.2025

Contacts: asiaseleman2016@gmail.com

Abstract

Introduction. Hibiscus sabdariffa L. is renowned for its therapeutic benefits, largely due to its high levels of active compounds, particularly polyphenols such as flavonoids and phenolic acids, which offer significant antioxidant protection.

Purpose. To evaluate the hibiscus's protective potentials on the testicular functions against chlorpyrifos (CPF) induced testicular damage.

Materials and methods. A total of 30 rats (weighing 175–200 g) were used in the experimental study. The rats were divided into five groups. The first group G1 was the control, group G2 was administered CPF at 10 mg/kg/day, G3, G4 and G5 groups pretreated with hibiscus extract (HBSC) at doses of 250 mg/kg or 750 mg/kg or vitamin C at a dosage of 100 mg/kg, respectively and then exposed to CPF at the same dosage as G2. All the doses are given orally for 28 days. At the end of the experiment, rats were sacrificed and then blood samples and tissue samples were collected for biochemical and histopathological analysis. The biological material for the study was blood serum, semen, and testicular tissue; biochemical, hormonal (using ELISA immunoassay method), morphological, histological, and other research methods were used in the study.

Results. The study revealed that CPF exposure caused decreased serum testosterone level, sperm count and motility, while increased proportion of non-motile sperm compared to control. Treatment with HBSC increases serum testosterone level, sperm count and motility, while decreases proportion of non-motile sperm compared to CPF group. Histopathological findings show that HBSC treatments have protection effects and causes normal histoarchitecture of the testis full with sperms.

Conclusion. The hormonal, sperm and histological findings suggest that HBSC may protect testicular function from CPF-induced oxidative effects, however, there is no difference in protection effect between the two HBSC doses.

Keywords: antioxidant, calyces extract, Hibiscus sabdariffa L., oxidative stress, reproductive system



Мортада Эсам Садик, Мухсин С. Аль Мозиль, Эйша С. Абдулла✉
Институт фармации, Басра, Ирак

Влияние добавок экстракта гибискуса на функции тестикул и окислительный стресс у крыс, подвергшихся воздействию хлорпирифоса

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Мортада Эсам Садик – концепция и дизайн исследования, сбор материала, написание текста; Мухсин С. Аль Мозиль – концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала; Эйша С. Абдулла – концепция и дизайн исследования, редактирование.

Этическое заявление. Обращение с животными соответствовало этическим нормам Международных этических руководящих принципов проведения исследований в области здоровья с участием людей и с использованием животных, разработанных Советом международных организаций медицинских наук в сотрудничестве со Всемирной организацией здравоохранения, и принципам Международного эпизоотического бюро. Получено разрешение Фармацевтического колледжа Университета Басры № EC50 от 1 сентября 2023 года.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 11.03.2025

Принята: 23.09.2025

Контакты: asiaselman2016@gmail.com

Резюме

Введение. Растение *Hibiscus sabdariffa* L. известно своими лечебными свойствами в основном благодаря высокому содержанию активных веществ, в частности полифенолов, таких как флавоноиды и фенольные кислоты, которые обладают выраженной антиоксидантной активностью.

Цель. Оценить защитное действие гибискуса в отношении функций тестикул при их повреждении, вызванном воздействием хлорпирифоса (ХПФ).

Материалы и методы. В экспериментальном исследовании использованы 30 крыс (с массой тела 175–200 г), которых разделили на 5 групп. Первая группа – G1 – была контрольной. Крысы из группы G2 получали ХПФ в дозе 10 мг/кг/сут. В группах G3, G4 и G5 крысы до начала эксперимента получали экстракт гибискуса (ГБСК) в дозах 250 мг/кг, 750 мг/кг, витамин С в дозе 100 мг/кг соответственно, а затем их подвергали воздействию ХПФ в той же дозе, что и крысы из группы G2. Все препараты применяли перорально в течение 28 сут. По окончании эксперимента крыс выводили из опыта и производили отбор образцов крови и тканей для биохимического и гистопатологического анализа. Биологическим материалом для исследования явились сыворотка крови, сперма, ткань тестикул; в работе были использованы биохимические, гормональные (с применением иммуноферментного метода анализа ELISA), морфологические, гистологические и другие методы исследования.

Результаты. Исследование показало, что воздействие ХПФ приводит к снижению уровня тестостерона в сыворотке крови, уменьшению числа сперматозоидов и их подвижности, а также к увеличению доли неподвижных сперматозоидов по сравнению с соответствующими показателями у крыс контрольной группы. Применение ГБСК способствует повышению уровня тестостерона в сыворотке крови, увеличению числа сперматозоидов и их подвижности, а также снижению доли неподвижных сперматозоидов по сравнению с аналогичными показателями в группе крыс, подвергнутых воздействию ХПФ – G2. Гистопатологические исследования показали,

что ГБСК обладает защитным действием и способствует восстановлению нормальной гистоархитектуры тестикул, заполненных сперматозоидами.

Заключение. Результаты гормональных, сперматологических и гистологических исследований позволяют полагать, что гибискус оказывает защитное действие на функцию тестикул при окислительном воздействии хлорпирифоса; при этом не было выявлено различий в защитном эффекте влияния на крыс двух разных дозировок гибискуса.

Ключевые слова: антиоксидант, экстракт чашечек, *Hibiscus sabdariffa* L., окислительный стресс, репродуктивная система

■ INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa L. (HBSC) belongs to the Malvaceae family, which comprises over 300 species [1] and has been used for over 3,000 years for its beneficial properties in food and medicine [2]. The HBSC, known as Gujarat in Iraq, is primarily referred to as Karkade in Arabic-speaking countries such as Sudan and Egypt [3]. Karkadi tea, made from calyces – cup-shaped leaves surrounding flower petals and seed capsules – can be enjoyed hot or cold. calyces are commonly found in local markets and are richer in active compounds than the stem, leaves, and seeds [4] *Hibiscus* calyces are rich in phytochemicals, especially polyphenolic compounds like flavonoids and phenolic acids. They also contain organic acids, vitamins, minerals, and essential nutrients such as carbohydrates, proteins, and fats, providing about 49 calories per 100 grams [5].

A lot of research has dealt with the therapeutic uses of hibiscus, including cardioprotective [6], prevention and treatment of high blood lipids [7], as a vasodilator [8], exhibits diuretic effects [9], hepatoprotective [10], antidiabetic [11], neuroprotective [12], improve hematological parameters [13], decreased risk of overweight and obesity [14], stimulate insulin secretion, and inhibit glucagon secretion [15], anti-inflammatory [16] and antioxidant properties [17].

Chlorpyrifos (CPF), an organophosphorus compound, is one of the most extensively utilized broad-spectrum chlorinated pesticides globally [18]. According to the World Health Organization's classification of pesticides, chlorpyrifos is categorized as moderately toxic [19]. The United States Environmental Protection Agency (EPA) banned the use of CPF in agriculture and limited its use to non-food applications [20], The European Commission's regulations prohibited the use of CPF and mandated its removal from the market on January 10, 2020 [21].

Chlorpyrifos irreversibly inhibits acetylcholinesterase enzyme, accumulating acetylcholine at nerve endings and neuromuscular junctions, which causes neuro damage [22]. But CPF, beyond blocking acetylcholine esterase, causes cell destruction by inducing oxidative stress [23], which results from either increased ROS formation [24] or decreased antioxidant potential [25]. ROS including hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻), are unstable compounds that damage nearby substances in their quest for stability. Cell membranes, particularly owing to abounding in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), are especially susceptible [26]. This damage can cause lipid peroxidation, compromising membrane integrity and potentially leading to cell death. The resulting lipid peroxides act as oxidizing agents, and oxidative stress (OS) activates pro-inflammatory cytokines



and initiates inflammatory responses that disrupt cellular function [27]. The antioxidant system (AOS) removes excess ROS from various sources and plays a crucial role in preserving cellular vitality against potential damage induced by oxidative stress [28]. Chronic and continuous exposure to chlorpyrifos has been seen to cause several health issues, including problems with the neurological, cardiovascular, and respiratory systems [29], DNA damage, gene mutations, and increased incidences of cancer [30]. CPF Reduce sperm quality and quantity [31], testosterone toxicity [32], Hematological toxicity [33], hepatotoxicity [34], thyroid gland toxicity [35], and Neurotoxicity [36].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To evaluate the hibiscus's protective potentials on the testicular functions against chlorpyrifos (CPF) induced testicular damage.

■ MATERIALS AND METHODS

Materials

Vitamin C, Chlorpyrifos and Dried calyces of *H. sabdariffa* were bought from the local Ashar market in Basrah state, Iraq. The origin of the hibiscus calyces is Nigeria. Chlorpyrifos is made in France under the trade name Ciko Span, and pure vitamin C is made in India.

The kit that was used to measure testosterone level in the rat serum was purchased from Sunlong Biotech CO., LTD, China. The chemicals and tools that were used to assess sperm analysis along with histological examination were used in the laboratories of the College of Pharmacy / Al-Basra University/Iraq.

Animals handling

The experiment commenced with the division of 30 rats (weight 175–200) purchased from an animal house farm-Tikrit-Iraq. Following a two-week adaptation period, rats were divided into five groups, each consisting of six rats as shown in Table 1. The experiment was designed to last 28 days, following previous trials that aimed at inducing oxidative stress through CPF in the rat's liver [25]. All doses are diluted with water to perform the desired concentration in 1 ml/dose, even CPF emulsion [37]. The 1m/dose concentrations are diverse as Chlorpyrifos at 2 mg/ml, Hibiscus extract at 50, 150 mg/ml, and vitamin C at 20 mg/ml. The doses were administered orally via Gavage, using a 1 ml syringe to withdraw, measure, and deliver the doses. This allowed adjustments to be made in 0.1 ml based on the rat's weight.

The animals were handled according to ethical principles of international Ethical Guidance for Health-related research involving humans or animals prepared by the Council International Organization of Medical Science (CIOMC) in collaboration with World Health Organizations (WHO), and following the framework of the Office International des Epizootic (OIE) principals. Authorized by the University of Basra / College of Pharmacy in Approval number EC50 on 1/9/2023.

Preparation of hibiscus extract

Aqueous HBSC Calyces extract is prepared by Using the Hot Maceration Method, which employs drinking water as a solvent at a 1 : 10 (calyces to water) ratio. 100 ml boiling water is added to 10 g of calyces and brewed for 1–2 hours without additional heating [38]. After filtering, the solvent is atmospheric evaporated in a water bath at 70–80 °C, producing

Table 1
Group design dividing the rats (30 rats) into 5 groups (each group has six rats) and the dosing continues for 28 days

Group name	Group type	Group treatment	Dose reference
G1	Negative control	Receive no treatment, only food and water	
G2	CPF group	Receive CPF 10 mg/kg/day	[40]
G3	Experiment group	Receive HBSC extract 250 mg/kg/day + CPF 10 mg/kg/day	[41]
G4	Experiment group	Receive HBSC extract 750 mg/kg/day + CPF 10 mg/kg/day	[42]
G5	Positive control	Receive Vit C 100 mg/kg/day + CPF 10 mg/kg/day	[43]

Notes: CPF – chlorpyrifos; HBSC – Hibiscus Sabdariffa extract; Vit C – vitamin C.

a dry, dark red precipitate [39]. The resultant precipitate is weighed, and to achieve the desired concentration (w/v), water is added per the weight of the residue to prepare a solution containing the required amount of HBSC extract in one milliliter.

Serum sampling and biochemical analysis

After the 28-day trial, rats were sacrificed and blood samples taken and centrifuged at 5000 RPM for 20 minutes. The serum was stored at -20 °C until the testing process was conducted. Serum levels of Testosterone were analyzed by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) method.

Tissue sampling

Tissue samples were obtained from the testicles and the collected samples were washed with normal saline and fixed in a 10% formaldehyde solution. They were dehydrated with ethanol and cleared with xylene to allow paraffin infiltration at 60 °C. After cooling to 20 °C, the solid block was cut into thin sections (4–6 µm) and placed on glass slides for Hematoxylin and Eosin staining [44].

Sperms sampling

The rat’s testicles and epididymis were removed, and the epididymis was cut from the tail to collect sperm in a petri dish. This dish, which contained a pre-prepared buffer solution, was placed in a water bath at 38 °C to mimic body temperature and protect the sperm from the shock of the cold environment. After adding the sperm from the epididymis to the buffer solution and mixing, 0.5 ml of the mixture was taken with a micropipette and placed on a slide, which was also warmed for the same reason. The slide was then examined under a light microscope to assess the sperm count, sperm motility, and the proportion of immotile sperm.

Statistical analysis

The analysis of the results was conducted employing IBM’s SPSS software, specifically utilizing One-Way Analysis of Variance (ANOVA) alongside the Tukey Post-Hoc Test to assess mean differences among various groups, and T-test to compare between two groups, P-value <0.05 was established to determine the presence of statistically significant



differences between groups, and the data were presented as mean $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean). All graphics were conducted using GraphPad Prism 10 software, utilizing SPSS results.

■ RESULTS

Rats weight throughout experiment periods

The mean weight of rats across all groups exhibited an increase during the research period except CPF group, the average weight of the rats in each group at the end of each week throughout the experimental duration illustrated in Fig. 1.

Testosterone levels

Group G2, which received 10 mg/kg/day of CPF, exhibited significantly lower levels of serum testosterone compared to all other groups, including the control group (G1) and those receiving protective treatments (G3, G4, G5). There were no significant differences in serum levels of testosterone between the control group and the groups receiving protective treatments, nor among the protective treatment groups themselves. As shown in fig. 2.

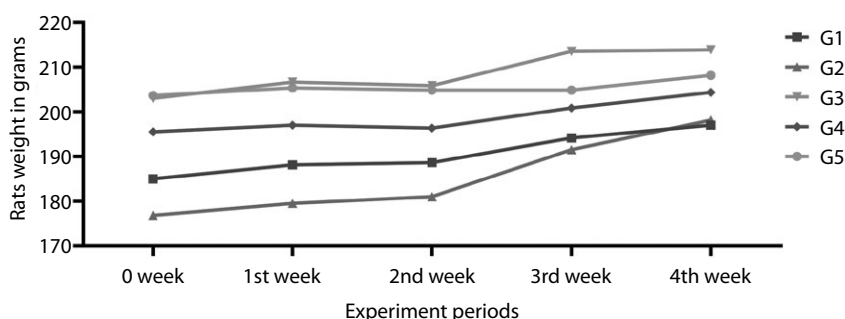


Fig. 1. Differences in the rat's body – weights in the research groups

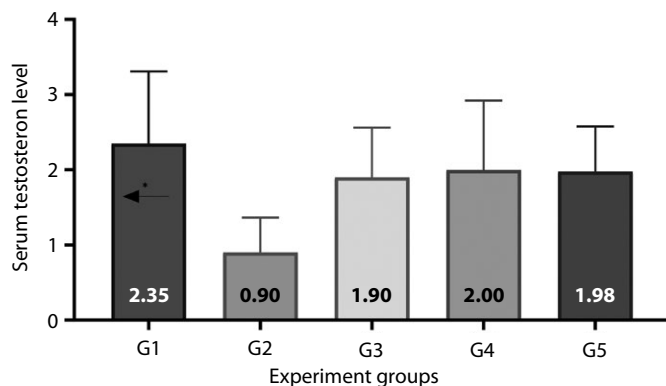


Fig. 2. Effect of chlorpyrifos and hibiscus subdariffa extract on serum Testosterone level in different rat groups. G1 (control group), G2 (chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G3 (hibiscus subdariffa extract 250 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G4 (hibiscus subdariffa extract 750 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day), G5 (vitamin C 100 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day). All data presented as mean $\pm$ SEM

Sperm analysis

The overall sperm count and the progressive motility of sperm were decreased and the proportion of non-motile sperm were increased by CPF exposure (G2) compared to control. There is no significant difference in sperm count, the progressive motility of sperm and proportion of non-motile sperm found in the groups pretreated with 250 mg/kg or 750 mg/kg of HBSC or 100 mg/kg vit C., as illustrated in Table 2 and Fig. 3.

Histopathological evaluation of testicular tissue

The rat testis of all groups were excised for investigation under the light microscope and the results of control appears normally seminiferous tubules full of spermatozoa with normal architecture of germinal cell proportion and Leydig cells. The testis of rat treated with 10 mg/kg BW of CPF showing severe germ cell loss and vacuolization, sloughing of germ cells into the tubular lumen and impaired spermatogenesis; seminiferous tubules with negative tubular differentiation and repopulation indices as well as severe edema and infiltration of immune mononuclear cells. The testis of rat treated with 250 mg/kg

Table 2
Analyzing sperm quality represented in motility, count and non-motile sperm using the optical microscope for each rat in the experiment

	G1	G2	G3	G4	G5
Sperm motility	90.83±1.54	34.17±6.88	82.83±1.83	84.17±2.39	84.16±3.01
Sperm count	89.17±2.39	40±9.92	80±2.81	80±2.81	80.83±1.82
Dead sperm	10.832.34	56.67±10.63	22±3.01	20±2.81	19.17±12.79

Notes: data represented as mean values ± SED. G1 (control), G2 (chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G3 (hibiscus subdariffa extract 250 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G4 (hibiscus subdariffa extract 750 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day), G5 (vitamin C 100 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day).

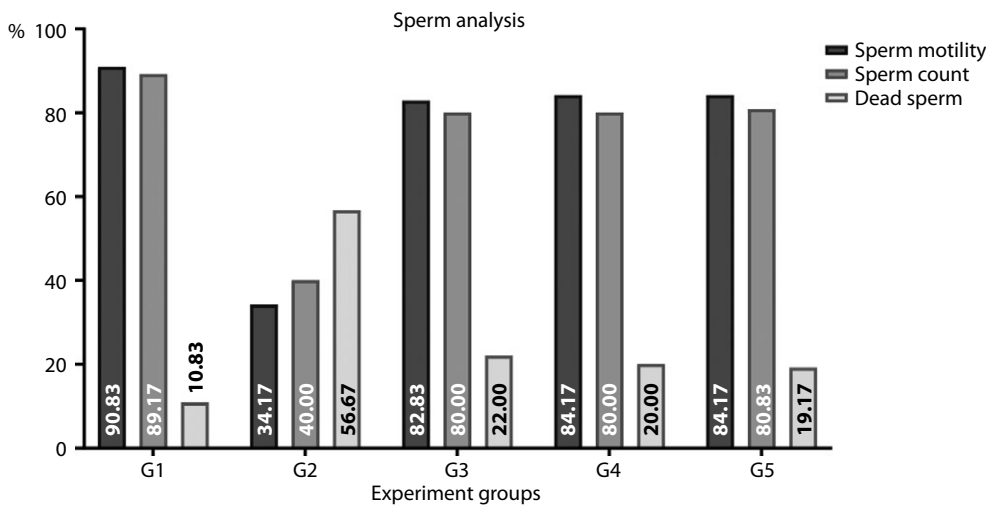


Fig. 3. Evaluation of sperm parameters, including motility, count, and the presence of dead sperm. The results are presented as mean values ± SED. G1 (control), G2 (chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G3 (hibiscus subdariffa extract 250 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/d), G4 (hibiscus subdariffa extract 750 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day), G5 (vitamin C 100 mg/kg/day + chlorpyrifos 10 mg/kg/day)

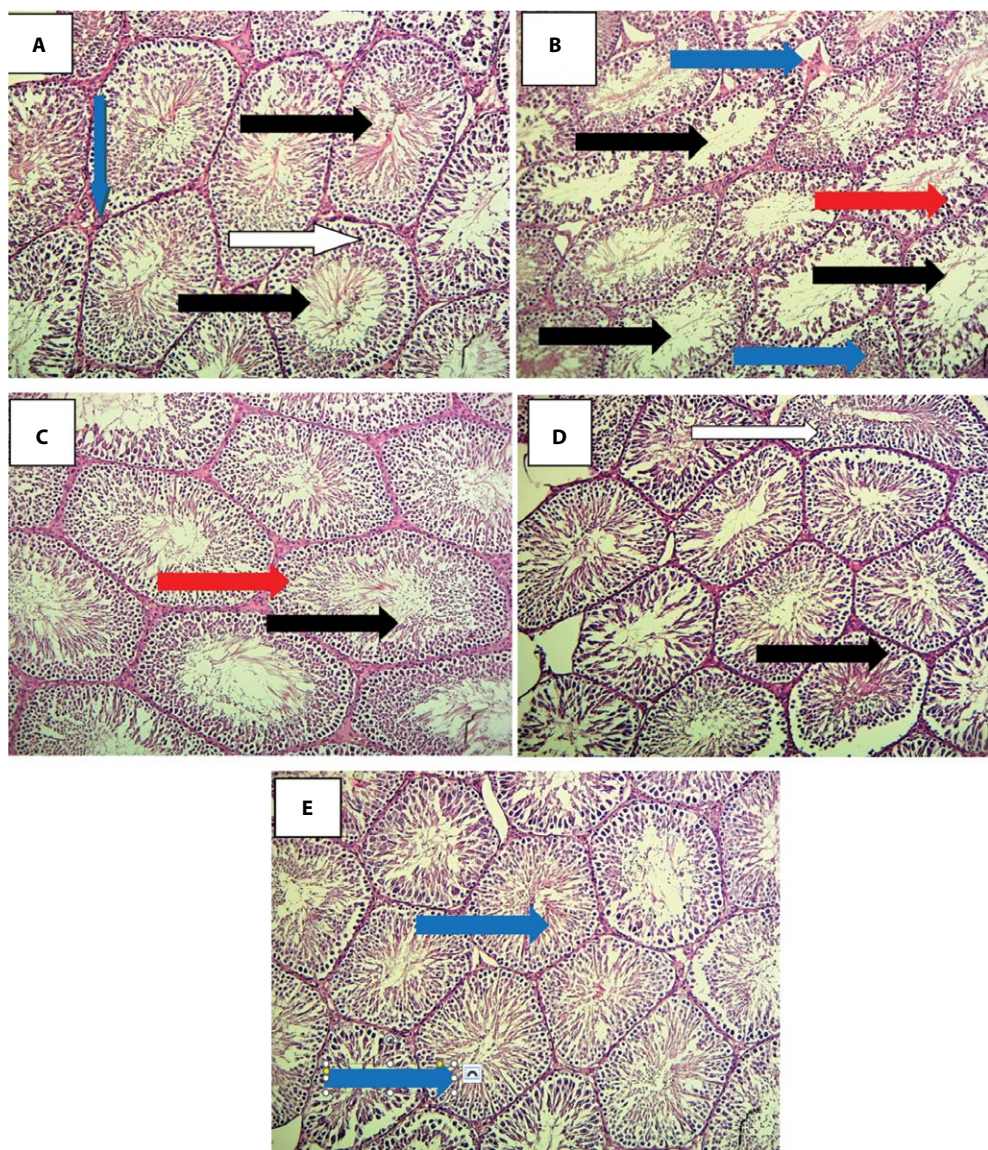


Fig. 4. Male rat testicular tissue (stained by the H and the E), examined by light microscope (20X):
A – Control group, appears normally seminiferous tubules full of spermatozoa observed (black arrows) with normal architecture of germinal cell proportion (white arrows) and Leydig cells (blue arrows).
B – Rats treated with 10 mg/kg of Chlorpyrifos, showing severe germ cell loss and vacuolization (black arrow), sloughing of germ cells into the tubular lumen and impaired spermatogenesis (red arrow); seminiferous tubules with negative tubular differentiation and repopulation indices as well as severe oedema and infiltration of immune mononuclear cells (blue arrow). **C** – Vitamin C treated group, showed seminiferous tubules morphological normally and similar manner in size (red arrow) with full spermatid (black arrow). **D** – Rats treated with 250 mg/kg of Hibiscus with 10 mg/kg of chlorpyrifos shows restoration of seminiferous tubules structure (white arrow) and germinal epithelium layers along with the presence of spermatid (black arrow). **E** – Rats treated with 750 mg/kg of Hibiscus and 10 mg/kg of chlorpyrifos (G4), showed recovery in almost normal testis architecture with an amount of spermatid in seminiferous tubules (blue arrow)

BW of Hibiscus with 10 mg/kg of CPF, shows restoration of seminiferous tubules structure and germinal epithelium layers along with the presence of spermatid. Furthermore, testis treated with 750 mg/kg BW of Hibiscus with 10 mg/kg of CPF showed recovery in almost normal testis architecture with an amount of spermatid in seminiferous tubules. In addition, the positive control group which are treated with Vitamin C, showed seminiferous tubules morphological normally and similar manner in size with full spermatid.

■ DISCUSSION

Organophosphorus are the foremost pesticides used in the agriculture, there extensive use have profound influence on environment, hazardous effects to human and all other organisms. Extensive use of these pesticides causes exposure to low doses that can cause a diversity of metabolic, cardiovascular, fertility and other diseases [44, 45].

Results of the current study exposed a significant increase in body weights of rats in all groups except for CPF group viewing a significant decrease in body weight gain and this reduction could be connected to oxidative stress [46]. A lot of research has dealt with the use of herbs as an antioxidants provides protective effects from oxidative stress [47–50].

The results revealed that CPF causes a significant reduction in serum testosterone level compared to control. Furthermore, sperm count and motility were decreased and the proportion of non-motile sperm were increased by CPF exposure compared to other groups. These effects of CPF may be linked to an increase in reactive oxygen species (ROS) that disrupt the function of testicular cells, such as Leydig cells that are responsible for producing testosterone. These results are in cope with previous study exposed that chlorpyrifos negatively impacts testosterone production in mice [51].

To determine if the effects of CPF related to oxidative stress, pre-treatment with potent antioxidant such as vit. C were used as a positive control and the results revealed no significant difference in serum testosterone level, sperm count, sperm motility and proportion of non-motile sperm found in the group pretreated with vit. C compared to control. These findings are consistent with previous study used vit. C to enhance sperm production and protecting testicular tissue from oxidative stress [52].

This study aimed at evaluation of the HBSC precipitate protective effect against CPF induced testicular damage in male rats. The results exposed no significant difference in serum testosterone level, sperm count, sperm motility and proportion of non-motile sperm found in the group pretreated with 250 mg/kg or 750 mg/kg of HBSC. These findings indicated that pretreatment with HBSC precipitate have a protective effect against CPF induced testicular damage in male rats.

In addition, the results exposed no significant difference in serum testosterone level, sperm count, sperm motility and proportion of non-motile sperm found in the group pretreated with HBSC precipitate compared to group pretreated with vit. C, suggests that HBSC extract as effective as vit. C in protection against CPF induced testicular damage in male rats. These results are in cope with the previous study demonstrated the potency of hibiscus as an antioxidant in maintaining testosterone level and preserving the histological structure of rat testicles against monosodium glutamate-induced oxidative damage [53].

Histopathological results of testicular tissue are consistent with biochemical results, these analysis reveals a notable improvement in testicular tissue composition of rats pretreated with HBSC extract or vit. C compared to CPF alone group. This is consistent with



the findings of previous study established the potency of hibiscus as an antioxidant in preserving testicular tissue of rat against Carbamazepine-induced oxidative damage [54].

Moreover, no significant difference was observed between the two administered doses of HBSC extract, indicated that the increase in HBSC extract dose from 250 to 750 mg/kg has no effect.

To our knowledge, much study has focused on the effect of HBSC extract and CF, independently in diet and their effects on the animal's reproductive system. However, records are missing that defines the effect of a mix of these two compounds in the daily diet on the animal's reproductive system.

■ CONCLUSION

Hibiscus is a plant that is abundant in bioactive compounds, which confer numerous advantages not only in culinary applications, but also in health. These compounds possess antioxidant properties and offer protection against oxidative stress. Consequently, it can be inferred that hibiscus has the potential to protect reproductive system, by mitigating the oxidative stress to which the body is subjected on a daily basis due to contemporary lifestyle factors. A modest serving of hibiscus tea may provide protective benefits for the body, mitigates damage associated with CPF.

■ REFERENCES

1. Apaliya MT, Kwaw E, Mahunu GK, et al. Nutritional properties and feeding values of Hibiscus sabdariffa and their products. In Roselle (Hibiscus sabdariffa) 2021 Jan 1 (pp. 137–154). Academic Press.
2. Riaz G, Chopra R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018 Jun 1;102:575–86.
3. Hassoon AS, Kadhim AA, Hussein MH. A Review in Medical, Pharmacological and Industrial Importance of Roselle Hibiscus sabdariffa L. In Medicinal Plants-Chemical, Biochemical, and Pharmacological Approaches 2023 Nov 16. Intech Open. DOI: 10.5772/intechopen.111592
4. Al-Wandawi H. Organic acids composition of different parts of the medicinal plant– roselle (Hibiscus sabdariffa). Int. J. Biol. Pharm. Res. 2015;6:808–13.
5. Singh P, Khan M, Hailemariam H. Nutritional and health importance of Hibiscus sabdariffa: a review and indication for research needs. Journal of Nutritional Health & Food Engineering. 2017;6(5):125–8.
6. Obouayeba AP, Meité S, Boyvin L, et al. Cardioprotective and anti-inflammatory activities of a polyphenols enriched extract of Hibiscus sabdariffa petal extracts in wistar rats. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2015 May 1;4(1):57–63.
7. Tarmooz AA, Al-Yasiri TH, Abdali Y. The use of Hibiscus sabdariffa infusion for the prevention and treatment of high blood lipids compared with Statin treatment. Plant Archives. 2020;20(2):812–7.
8. Montalvo-González E, Villagrán Z, González-Torres S, et al. Physiological effects and human health benefits of Hibiscus sabdariffa: a review of clinical trials. Pharmaceuticals. 2022 Apr 12;15(4):464.
9. Yusni Y, Meutia F. Action mechanism of Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) used to treat metabolic syndrome in elderly women. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2020;1:1–6. <https://doi.org/10.1155/2020/5351318>
10. Obouayeba AP, Boyvin L, M'Boh GM, et al. Hepatoprotective and antioxidant activities of Hibiscus sabdariffa petal extracts in Wistar rats. Int J Basic Clin Pharmacol. 2014 Sep;3(5):774–80.
11. Hamadjida A, Metechie LC, Tchiengang FD, et al. Antidiabetic potential of Hibiscus sabdariffa extract in alloxan-induced diabetic rats. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. 2023;23(1):193–203.
12. El-Shiekh RA, Ashour RM, Abd El-Haleim EA, et al. Hibiscus sabdariffa L.: A potent natural neuroprotective agent for the prevention of streptozotocin-induced Alzheimer's disease in mice. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020 Aug 1;128:110303. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110303>
13. Orororo OC, Asagba SO. Treatment with Hibiscus sabdariffa L anthocyanins improve hematological parameters in rats exposed to cadmium. Journal of Exploratory Research in Pharmacology. 2022 Sep 25;7(3):146–50.
14. Jamrozik D, Borymska W, Kaczmarczyk-Żebrowska I. Hibiscus sabdariffa in diabetes prevention and treatment – Does it work? An evidence-based review. Foods. 2022 Jul 19;11(14):2134.
15. Amos A, Khiatah B. Mechanisms of action of nutritionally rich Hibiscus sabdariffa's therapeutic uses in major common chronic diseases: a literature review. Journal of the American Nutrition Association. 2022 Jan 2;41(1):116–24.
16. Hamadjida A, Mbomo RE, Minko SE, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Boswellia dalzielii and Hibiscus sabdariffa extracts in alloxan-induced diabetic rats. Metabolism Open. 2024 Mar 1;21:100278.
17. Lubis M, Siregar GA, Bangun H, Ilyas S. The effect of roselle flower petals extract (Hibiscus sabdariffa Linn.) on reducing inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis. Medisnik Glasnik. 2020 Jul 12;17(2):395–401.

18. Varghese EM, P A, MS J. Strategies in microbial degradation enhancement of chlorpyrifos – a review based on the primary approaches in soil bioremediation. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2022 Mar 4;40(2):83–94.
19. Farsani AT, Arabi M, Shadkhast M. Ecotoxicity of chlorpyrifos on earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826): Modifications in oxidative biomarkers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2021 Nov 1;249:109145.
20. Baker ES, Moon KJ, Branco RC. Chlorpyrifos: Who Paid and Who Profited? *Environmental Justice*. 2024 Feb 1;17(1):79–84.
21. Todorova TI, Parvanova PN, Čavuš H, et al. Set of Tests for Chlorpyrifos Toxicity Screening. *Ecologia Balkanica*. 2020 Dec 2:227–239.
22. Anwesh Y, Boinepally R, Lakshman M, et al. Biochemical and free radical-mediated nephrotoxicity induced by imidacloprid (IMI) and Chlorpyrifos (CPF) in Male Wistar Rats. *Pharma Innovation*. 2023;12(7):62–67.
23. Falfushynska H, Khatib I, Kasianchuk N, et al. Toxic effects and mechanisms of common pesticides (Roundup and chlorpyrifos) and their mixtures in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Science of the Total Environment*. 2022 Aug 10;833:155236.
24. Dissanayake WM, Heo JM, Yi YJ. Adverse effects of pesticide/metabolites on boar spermatozoa. *Korean Journal of Agricultural Science*. 2023;50(4):941–52.
25. Abdel-Naim AB, Hassanein EH, Binmahfouz LS, et al. Lycopene attenuates chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in rats via activation of Nrf2/HO-1 axis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023 Sep 1;262:115122.
26. Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature metabolism*. 2022 Jun;4(6):651–62.
27. George J, Lu Y, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Cellular and molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury: The role of oxidative stress and therapeutic approaches. *Redox biology*. 2024 Jun 27:103258.
28. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, et al. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*. 2022;2:48–78.
29. Hussain OA, Hathout AS, Abdel-Mobdy YE, et al. Preparation and characterization of activated carbon from agricultural wastes and their ability to remove chlorpyrifos from water. *Toxicology Reports*. 2023 Jan 1;10:146–54.
30. Dai HM, Deng YY, Zhang C. Progress in researches on health effects of chlorpyrifos: a review. *Chinese Journal of Public Health*. 2016;32(7):995–8.
31. Hazarika J, Ganguly M, Borgohain G, et al. Disruption of androgen receptor signaling by chlorpyrifos (CPF) and its environmental degradation products: a structural insight. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2022 Jul 21;40(13):6027–38.
32. Yuqiong LI, Jiabin GU, Huanfeng YE, et al. Effects of chlorpyrifos on mRNA expression of genes related to testosterone synthesis in male offspring of mice. *Chinese Journal of Pesticide Science*. 2020 Sep 11;22(5):808–14.
33. Laghari Z, Munir N, Hayat M, et al. Effects of chlorpyrifos on testicular biochemistry and physiology of male sprague dawley rats. *IJB*. 2020;17:75–87.
34. Abdel-Karim RI, Hashish RK, Badran DI, et al. The ameliorative effect of cerium oxide nanoparticles on chlorpyrifos induced hepatotoxicity in a rat model: Biochemical, molecular and immunohistochemical study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2024 Jan 1;81:127346.
35. Abdelfadeel K, Mohamed M, Abd Elbaki B. Evaluation of the protective role of montelukast against the toxic effects of chlorpyrifos on thyroid gland of adult male albino rats (A histological and immunohistochemical study). *Journal of Medical Histology*. 2023 Jun 1;7(1):113–31.
36. Li W, Ehrich M. Effect of chlorpyrifos on VEGF gene expression. *Chemico-biological interactions*. 2023 Sep 1;382:110573.
37. Milošević MD, Mašković PZ, Stanković VD, et al. Protective effects of Viscum album L. leaf extract on chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Journal of King Saud University-Science*. 2022 Jun 1;34(4):101957.
38. Pacheco-Coello F, Franco-De Jesús L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of Hibiscus sabdariffa and Camellia sinensis. *Algerian Journal of Natural Products*. 2021 Jan 1;9(1):814–819.
39. Chumsri P, Sirichote A, Itharat A. Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (Hibiscus sabdariffa Linn.) extract. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 2008 Jan 2;30(1):133–139.
40. Albasheer G, Albrahim T, Alsultan N, et al. Red beetroot extract mitigates chlorpyrifos-induced reprotoxicity associated with oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020 Feb;27:3979–91.
41. Ebhohon SO, Ibeh RC, Ejiofor E, et al. Aqueous extract of Hibiscus Sabdariffa ameliorates cadmium-induced liver and kidney injuries in male Wistar rats. *Society for Experimental Biology of Nigeria*. 2019;19(1):55–9.
42. Wati L, Chiuman L, Nasution AN, Ginting CN. Anti-diabetic activity of the rose petal methanolic extract in alloxan-diabetic rats. In 2021 IEEE International Conference on Health, Instrumentation & Measurement, and Natural Sciences (InHeNce) 2021 Jul 14 (pp. 1–5). IEEE.
43. Mishra R, Dutta K, Bharali MK. Interaction of L-ascorbic acid and α -tocopherol in alleviating 1, 4-benzoquinone, a metabolite of benzene induced genotoxicity in male Wistar rats. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2023 Dec 31;10(1):290–301.
44. Abdulretha SD, Abdullah AS, Muhsin SG. AL-Mozie'I. Cardiovascular toxicity of Chlorpyrifos in female adult rats: a probable protective effect of phytochemical isoflavones. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences, Bull. Pharm. Sci., Assiut University*. 2022;45(2):895–902.
45. Abdulretha SD, Abdullah AS, Muhsin SG. AL-Mozie'I. Phytochemical effects of genistein and daidzein on sex hormones and corticosterone in female adult rats exposed to Chlorpyrifos. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2022 Sep;14(3):261–7.
46. Mossa AT, Swelam ES, Mohafrash SM. Sub-chronic exposure to fipronil induced oxidative stress, biochemical and histopathological changes in the liver and kidney of male albino rats. *Toxicology reports*. 2015 Jan 1;2:775–84.
47. Al-Seray GH, Abdullah AS, AL-Mozie'I MS. Iraqi Propolis, Carbimazole, Levothyroxine and their Propolis Combinations Effects on Renal Histopathological Parameters in Female Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2022 Jan 5;64:e21210209.
48. Hawraa M, Abdullah AS, Muhsin SG. AL-Mozie'I. Renal protective effects of Soy Isoflavones compared to carvedilol in rat models of glycerol induced acute renal injury. *Laboratory Diagnostics Eastern Europe Journal*, 2024;13(3). <https://doi.org/10.34883/PL.2024.13.3.014>
49. Abdullah AS, AL-Mozie'I MS, Al-Seray GH. Effects of Iraqi Propolis, Carbimazole and Levothyroxine on the Liver: Histopathological Study in Normal Female Rats. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. 2021 Jul 1;15(3):2065–69.
50. Kadhim SN, Abdullah AS, Sabah AI. Treatment modality, diabetic control and blood homeostasis in type 2 diabetes mellitus patients in Basra. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2021 Jul 15;34(2):70–3.
51. Nozad A, Hanachi P, Mohebbi S. The Effects of Thymoquinone of Black Seed Plant on Sperm Parameters, Hormones, and Oxidative Stress in Mice Poisoned by Chlorpyrifos. *Arch. Adv. Biosci*. 2024 Jan 1;15:E44232.
52. Behairy A, El-Sharkawy NI, Saber TM, et al. The modulatory role of vitamin C in boldenone undecylenate induced testicular oxidative damage and androgen receptor dysregulation in adult male rats. *Antioxidants*. 2020 Oct 28;9(11):1053.
53. Gad FA, Farouk SM, Emam MA. Antiapoptotic and antioxidant capacity of phytochemicals from Roselle (Hibiscus sabdariffa) and their potential effects on monosodium glutamate-induced testicular damage in rat. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021 Jan;28:2379–90.
54. Suleiman I, Kawu MU, Tanko Y, Shittu M. Effect of co-administration of aqueous extract of Hibiscus sabdariffa Linn (Malvaceae) calyx and vitamin E on carbamazepine-induced testicular changes in adult wistar rats. *Int J Novel Res Life Sci*. 2015;2(1):22–33.