

МЕЖДУНАРОДНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

2026, том 15, № 1

Восточная
Европа

Laboratory Diagnostics Eastern Europe

International Scientific Journal

2026 Volume 15 Number 1



Сердолик, или карнеол, – полудрагоценный минерал, по физико-химическим свойствам совпадающий с халцедоном и, по сути, являющийся его разновидностью. Особенности окраски сердолика обусловлены составом и характером распределения примесей, а в качестве главного хромофора выступает гематит, находящийся в нем в виде тонкодисперсных равномерно распыленных микрочастиц. Известен с древних времен. Так, состоятельные египтяне носили застёжки из сердолика в виде трехлистного клевера, что означало покровительство богини Исида, ассоциирующейся с этим камнем. Европейское же дворянство начиная с эпохи Ренессанса часто использовало его для изготовления перстней с фамильным гербом и перстней-печаток.

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

2026, том 15, № 1

2026 Volume 15 Number 1

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 "Kriativ 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: 05.02.2026
Формат 70×100 1/16 (165×240 мм)
Печать офсетная
Тираж 1000 экз.
Заказ №

Sent for the press: 05.02.2026
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», 2026

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2026

© "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", 2026

© Design and decor of UE "Professional Editions", 2026

НА ПЕРВУЮ

НА СЛЕДУЮЩУЮ

НА ПРЕДЫДУЩУЮ

К СОДЕРЖАНИЮ

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

Припутневич Татьяна Валерьевна,
д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, 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., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, 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., д.б.н., проф., проф. РАН, 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., д.б.н., проф., чл.-корр. РАН, 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

2026, том 15, № 1

2026 Volume 15 Number 1

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: 05.02.2026
Дата выхода в свет: 16.02.2026
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», 2026

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: 05.02.2026
Release date: 16.02.2026
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", 2026

НА ПЕРВУЮ

НА СЛЕДУЮЩУЮ

НА ПРЕДЫДУЩУЮ

К СОДЕРЖАНИЮ

Editors-in-Chief:

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

Tatiana V. Priputnevich,

Dr. of Med. Sci., Prof., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, 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., Dr. of Biol. Sci., Prof., Corresponding Member of RAS, 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., Dr. of Biol. Sci., Prof., Prof. of RAS, 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., Dr. of Biol. Sci., Prof., Corresponding Member of RAS, 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!

Представленный вашему вниманию очередной номер журнала – первый в наступившем 2026 году – содержит большую серию публикаций (9 из 14), посвященных разработке и использованию в клинической практике молекулярно-биологических методов исследования, что во многом определило его тематический характер как «молекулярно-биологический».

В последние годы направление работ по применению технологий молекулярно-биологического исследования в медицине стало своеобразным трендом в области клинической лабораторной диагностики. Выявление генетических нарушений позволило раскрыть наследственно обусловленную предрасположенность к формированию многих заболеваний. А это, в свою очередь, в целом способствовало созданию и дальнейшему развитию предсказательной и персонализированной медицины благодаря активному внедрению в клиническую практику технологий молекулярно-биологического исследования, включающего молекулярно-генетические, цитогенетические и другие методы анализа. К настоящему времени они нашли весьма широкое применение в различных областях клинической лабораторной диагностики – как для диагностики различных по этиологии заболеваний, так и для своевременного принятия эффективных мер профилактики их прогрессирующего развития.

Содержание 5 статей охватывает различные аспекты использования технологий молекулярно-биологического исследования в области клинической микробиологии как одного из разделов научной специальности «клиническая лабораторная диагностика», что позволило открыть созвучную этому направлению исследования рубрику.

Внимание врачей не могут не привлечь представленные в опубликованных статьях сведения об особенностях состояния микробиоты кишечника при нарушении фертильности у женщин (Кириллова Е.Д., Чернуха Г.Е., Пронина В.А., Муравьева В.В., Припутневич Т.В., Москва), о новых разработанных молекулярно-генетических технологиях быстрого обнаружения кишечных патогенов в образцах фекалий (Давыдова Е.Е., Толоконцева А.А., Лупарев А.Р., Полякова В.А., Гордукова М.А., Шипулин Г.А., Москва), об особенностях клинических проявлений и данных лабораторных показателей крови у детей при респираторной микоплазменной инфекции (Мокаева А.А., Хараева З.Ф., Нальчик). Две статьи этой рубрики, авторами которых стали



наши коллеги из Ирака (Самир А. Джавад, Ватик А. Аль-дарги, Багдад; Али Р.Х., Джарулла А.Б., Абдулхусейн С.Х., Аль-Шатра), посвящены проблеме формирования механизмов антибиотикорезистентности бактерий, в том числе встречаемой в хирургической практике.

В одной из опубликованных статей содержится информация о разработке и внедрении инновационных технологий молекулярно-генетического исследования в практику лечения пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями (Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Карпейчик Ю.В., Пивоварчик С.Н., Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е., Субоч Е.И., Портянко А.С., Минск).

Пять статей раскрывают тему использования технологий молекулярно-генетического анализа в практической деятельности врача. Одна из таковых посвящена изучению морфологических изменений хромосом (Требка Е.Г., Головатая Е.И., Минск).

Привлекает также внимание информация о технологиях молекулярно-генетического анализа, используемых для диагностики наследственных нарушений иммунитета (Скоповец Е.Я., Полякова Е.А., Гурьянова И.Е., Володащик Т.П., Сакович И.С., Белевцев М.В., Минск), в том числе при беременности (Дикая Т.В., Гольдинберг Б.М., Климович О.В., Минск), о хромосомных нарушениях при онкологической патологии системы кроветворения (Волочник Е.В., Капуза Д.Р., Вшивкова О.С., Мелешко А.Н., Минск).

В завершающей части номера размещены статьи, затрагивающие тему трактовки результатов клинико-лабораторного исследования – клинико-лабораторную информатику. Одна из них (Першенкова О.С., Михайлова Е.И., Гомель) содержит новые сведения о характере изменений уровня С-реактивного белка при алкогольной болезни печени; другая (Худа Кадим Карим, Шайма Джаббар Райсан, Басра, Ирак) сообщает об особенностях изменения активности глутаматдегидрогеназы сыворотки крови у пациентов-мужчин разных возрастных групп с сахарным диабетом 1-го и 2-го типов.

Желаю всем читателям больших творческих успехов в профессиональной и научной деятельности, базирующихся на применении современных, в том числе молекулярно-биологических, технологий лабораторного исследования!

Главный редактор в Беларуси
Владимир Семенович Камышников



**Клиническая микробиология /
Состояние микробиоты при патологии
фертильности у женщин**
*Кириллова Е.Д., Чернуха Г.Е., Пронина В.А.,
Муравьева В.В., Припутневич Т.В.*
Состав кишечной микробиоты
и эндокринно-метаболические
нарушения при синдроме
поликистозных яичников 11

**Клиническая микробиология /
Грибковая патология органов дыхания**
Мокаева А.А., Хараева З.Ф.
Клинико-лабораторные особенности
проявления респираторной
микоплазменной инфекции у детей
в Кабардино-Балкарской Республике
в 2024 году 24

**Клиническая микробиология /
Инновационные технологии
исследований на основе ПЦР-анализа**
*Давыдова Е.Е., Толоконцева А.А.,
Лупарев А.Р., Полякова В.А.,
Гордукова М.А., Шипулин Г.А.*
Метод быстрого обнаружения кишечных
патогенов в образцах фекалий
на основе мультиплексной
изотермической амплификации 37

**Клиническая микробиология /
Антибиотикорезистентность
в клинической практике**
Али Р.Х., Джарулла А.Б., Абдулхусейн С.Х.
Идентификация мультирезистентных
штаммов *Pseudomonas aeruginosa*
и *Staphylococcus aureus* у пациентов
с ожогами и ранами 51

**Клиническая микробиология /
Антибиотикорезистентность
и ее оценка при помощи сочетанного
использования методов химико-
микроскопического и молекулярно-
генетического анализа**
Самир А. Джавад, Ватик А. Альдарги
Уровень экспрессии генов эффлюксной
системы (помпы) *MexAB-OprM*
и генов вирулентности в клинических
изолятах *Pseudomonas aeruginosa*:
предполагаемое влияние на устойчивость
к антимикробным препаратам 62

**Молекулярно-биологические
исследования /
Инновационные технологии
ПЦР-анализа в онкологии**
*Смирнов С.Ю., Медведь А.В.,
Карпейчик Ю.В., Пивоварчик С.Н.,
Вахомчик Т.Г., Короткевич П.Е.,
Субоч Е.И., Портянко А.С.*
Разработка методов диагностики
аденокарциномы легкого на основе
детекции циркулирующей
опухолевой ДНК с использованием
технологии цифрового
капельного ПЦР-анализа 69

**Молекулярно-биологические
исследования /
Технологии молекулярно-
генетического анализа
в практической деятельности врача**
*Авдонина М.А.,
Куклина Н.Г.,
Шипулин Г.А.*
Сравнительный анализ методов
экстракции РНК из образцов
периферической крови 78

**Молекулярно-биологические
исследования /
Новые аспекты в изучении
морфологических изменений хромосом**
*Требка Е.Г.,
Головатая Е.И.*
Проблемы диагностики структурной
патологии хромосом при проведении
стандартного кариотипирования:
собственные наблюдения 87

**Молекулярно-биологические
исследования /
Хромосомные нарушения
при онкологической патологии
органов системы кроветворения**
*Волочник Е.В., Капуза Д.Р.,
Вшивкова О.С.,
Мелешко А.Н.*
Эволюция кариотипа лейкоэмических
клеток при рецидиве острого
лимфобластного лейкоза
из В-клеток-предшественников
у пациентов детского и молодого
взрослого возраста 103

Молекулярно-биологические исследования /**Нарушения иммунного статуса при акушерской патологии**

Дикая Т.В., Гольдинберг Б.М., Климович О.В.
 Морфология антигена D системы Rh и причины ослабления его фенотипического проявления при беременности: обзор литературы 117

Технологии молекулярно-биологического исследования /
ПЦР-диагностика наследственных нарушений иммунитета

Скоповец Е.Я., Полякова Е.А., Гурьянова И.Е., Володащук Т.П., Сакович И.С., Белевцев М.В.
 Технология ПЦР-анализа в режиме реального времени для выявления мутации основателя в гене NBS1 как причины формирования синдрома Ниймеген 132

Клинико-лабораторная информатика /
Новые представления об информативности традиционно используемых тестов лабораторной диагностики гепатопатии

Першенкова О.С., Михайлова Е.И.
 С-реактивный белок и алкогольная болезнь печени 139

Худа Кадим Карим, Шайма Джаббар Райсан
 Возрастные особенности содержания глутаматдекарбоксилазы в сыворотке крови пациентов (мужчин) с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа 151

Клиническая цитология в онкологической практике /
Клинический случай

Черкасова Ю.Б., Жедринская Е.В., Соколова А.И., Ребров Д.С., Абдуллаева А.Р., Цибирова А.Р., Павлов Б.В.
 Значение цитологической диагностики методом тонкоигльной аспирационной биопсии при карциноме молочной и щитовидной желез: клинический случай 159

**Clinical Microbiology /
Microbiota Status in Women
with Fertility Disorders**

*Kirillova E., Chernukha G., Pronina V.,
Muravyova V., Priputnevich T.*
Composition of Intestinal Microbiota
and Endocrine-Metabolic Disorders
in Polycystic Ovary Syndrome 12

**Clinical Microbiology /
Fungal Pathology
of the Respiratory Organs**

Mokaeva A., Kharaeva Z.
Clinical and Laboratory Features
of Respiratory Mycoplasma
Infection Manifestation in Children
in the Kabardino-Balkarian Republic
in 2024 26

**Clinical Microbiology /
Innovative Research Technologies
Based on PCR Analysis**

*Davydova E., Tolokontseva A., Luparev A.,
Polyakova V., Gordukova M., Shipulin G.*
Rapid Detection of Intestinal Pathogens
in Fecal Samples Based on Multiplex
Isothermal Amplification 36

**Clinical Microbiology / Antibiotic
Resistance in Clinical Practice**

Ali R.H., Jarullah A.B., Abdulhusein S.H.
Identification of Multi-Drug-Resistant
Pseudomonas Aeruginosa
and *Staphylococcus Aureus* from Burns
and Wounds Patients 50

**Clinical Microbiology /
Antibiotic Resistance and Its
Assessment Using Combined
Methods of Chemical-Microscopic
and Molecular-Genetic Analysis**

Sameer A. Jawad, Wathiq A. Aldarghi
Expression Patterns of MexAB-OprM
Efflux Pump and Virulence Genes
in Clinical Isolates of *Pseudomonas*
Aeruginosa: Implications
for Antimicrobial Resistance 61

**Molecular Biology Research /
Innovative PCR Analysis Technologies
in Oncology**

*Smirnou S., Miadzvedz A., Karpeichyk Y.,
Pivavarchyk S., Vakhomchik T.,
Karatkevich P., Subach H., Portyanko A.*
Elaboration of Diagnostic Methods for Lung
Adenocarcinoma Based on Circulating
Tumor DNA Detection Using Digital
Droplet PCR Technology 70

**Molecular Biology Research /
Molecular Genetic Analysis Technologies
in Medical Practice**

Avdonina M., Kuklina N., Shipulin G.
Comparative Analysis of Methods
for RNA Extraction from Peripheral
Blood Samples 79

**Molecular Biology Research /
New Aspects in the Study
of Morphological Changes
in Chromosomes**

Trebka E., Golovataja E.
Issues in Diagnosing Structural
Chromosome Pathology Using
Standard Karyotyping:
Own Observations 88

**Molecular Biological Research /
Chromosomal Abnormalities
in Oncological Pathology
of the Hematopoietic System**

*Valochnik A., Kapuza D.,
Vshyukova V., Meleshko A.*
Karyotype Evolution in Leukemic
Cells at Relapse of B-cell
Precursor Acute Lymphoblastic
Leukemia in Pediatric
and Young Adult Patients 104

**Molecular Biology Research /
Immune Disorders in Obstetric Pathology**

Dzikaya T., Gol'dinberg B., Klimovich O.
Morphology of (Rh) D Antigen and Reasons
for its Impaired Phenotypic Expression
in Pregnancy: A Literature Review 118

Molecular Biological Research Technologies / PCR Diagnostics of Hereditary Immune Disorders

Skapavets K., Polyakova E., Guryanova I., Volodashchik T., Sakovich I., Belevtsev M.
Real-Time PCR Technology for Identifying the Founder Mutation in the NBS1 Gene as the Cause of Nijmegen Syndrome 133

Clinical Laboratory Informatics / New Concepts on the Informativeness of Traditionally Used Laboratory Diagnostic Tests for Hepatopathy

Pershenkova O., Mikhailova E.
C-Reactive Protein and Alcoholic Liver Disease 140

Huda Kadhim Kareem, Shaymaa Jabbar Raisan
Evaluation of the Concentration of Bioenzyme Glutamic Acid Decarboxylase in the Sera of Type 1 and Type 2 Diabetic Patients 150

Clinical Cytology in Oncology Practice / Case Report

Cherkasova Yu., Zhedrinskaya E., Sokolova A., Rebrov D., Abdullayeva A., Tsibirova A., Pavlov B.
Significance of Cytological Diagnostics by Fine-Needle Aspiration Biopsy in Breast and Thyroid Carcinoma: A Case Report 160



<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.016>



Кириллова Е.Д.¹✉, Чернуха Г.Е.¹, Пронина В.А.¹, Муравьева В.В.¹, Припутневич Т.В.¹⁻³

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

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия

Состав кишечной микробиоты и эндокринно-метаболические нарушения при синдроме поликистозных яичников

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: написание текста – Кириллова Е.Д., Пронина В.А.; концепция, редактирование – Чернуха Г.Е., Припутневич Т.В.; статистический анализ, визуализация – Кириллова Е.Д.; сбор и обработка материала, редактирование текста – Муравьева В.В.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка комплексного обследования для диагностики гормонально-ассоциированных заболеваний и проявлений функционального состояния эндометрия на основе изучения микробиоты» (122020900123-4).

Этическое заявление: исследование было одобрено локальным этическим комитетом Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова (протокол № 12 от 25 ноября 2021 г.).

Информированное согласие: все женщины, включенные в исследование, подписали информированное согласие на участие.

Подана: 18.10.2025

Принята: 29.01.2026

Контакты: emiroshina.md@gmail.com

Резюме

Цель. Изучить состав микробиоты кишечника и ее связь с метаболическими параметрами пациенток с синдромом поликистозных яичников.

Материалы и методы. В одномоментное исследование включены 140 пациенток с синдромом поликистозных яичников и 30 женщин группы сравнения. Среди специальных методов обследования выполнены оценка метаболического профиля плазмы крови, денситометрия жировой ткани и микробиологическое исследование методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. У пациенток с синдромом поликистозных яичников выявлено большее число условно-патогенных микроорганизмов *Clostridium perfringens* gr., *Staphylococcus* spp. и меньшее количество симбионтных бактерий *Clostridium leptum* gr. и *Prevotella* spp., чем в группе сравнения. Уровень глюкозы плазмы крови положительно коррелировал с численностью УПМ *C. perfringens* gr. ($r=0,3$, $p=0,03$) и отрицательно – с симбионтами *C. leptum* gr. ($r=-0,4$, $p=0,01$) и *Faecalibacterium prausnitzii* ($r=-0,3$, $p=0,04$). Численность *C. leptum* также отрицательно коррелировала и с массой висцеральной жировой ткани ($r=-0,4$, $p=0,04$). При ожирении отмечено снижение количества бактерий группы *C. leptum* ($9,0\pm0,5$ и $8,3\pm1,0$ соответственно, $p=0,019$) и рода *Bifidobacterium* ($6,8\pm2,5$ и $8,1\pm0,8$ соответственно, $p=0,016$).

Заключение. Кишечная микробиота при синдроме поликистозных яичников характеризуется снижением видового богатства и сдвигом баланса микроорганизмов в сторону увеличения колонизации условно-патогенных микроорганизмов вида *C. perfringens* и *C. difficile*, рода *Staphylococcus* на фоне снижения численности симбионтов (*C. leptum* gr., *Prevotella* spp., *Akkermansia muciniphila*, *F. prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Bacteroides* spp.), поддерживающих колонизационную резистентность кишечника. Дисбаланс кишечной микробиоты ассоциирован с наличием избытка жировой ткани и метаболическими нарушениями.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников (СПКЯ), микробиота кишечника, ПЦР, метаболические нарушения, ожирение

Kirillova E.¹✉, Chernukha G.¹, Pronina V.¹, Muravyova V.¹, Pripitnevich T.¹⁻³

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

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Composition of Intestinal Microbiota and Endocrine-Metabolic Disorders in Polycystic Ovary Syndrome

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: text writing – Kirillova E., Pronina V.; concept, editing – Chernukha G., Pripitnevich T.; statistical analysis, visualization – Kirillova E.; collection and processing of material, text editing – Muravyova V.

Funding: the work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation "Working out a comprehensive examination for the diagnosis of hormone-associated diseases and manifestations of the functional state of the endometrium based on the study of microbiota" (122020900123-4).

Ethics statement: the study was approved by the Ethics Committee for Biomedical Research of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov (protocol No. 12 dated November 25, 2021).

Informed consent: all women enrolled in the study signed informed consent for participation.

Submitted: 18.10.2025

Accepted: 29.01.2026

Contacts: emiroshina.md@gmail.com

Abstract

Purpose. To analyze the gut microbiota composition and its impact on metabolic parameters in patients with polycystic ovary syndrome.

Materials and methods. A cross-sectional study included 140 patients with polycystic ovary syndrome and 30 women of comparison group. A clinical laboratory examination was conducted, including metabolic blood profile, densitometry, and real-time PCR.

Results. In PCOS, a higher number of opportunistic microorganisms *Clostridium perfringens* gr., and *Starchulococcus* spp. was detected than in the comparison group, while the number of symbiont bacteria *Clostridium leptum* gr. and *Prevotella* spp. was lower than in the comparison group. The number of *C. perfringens* gr. positively correlated with fasting blood glucose levels ($r=0.3$, $p=0.03$). A negative correlation was observed between the number of *Clostridium leptum* gr. and fasting glucose levels ($r=-0.4$, $p=0.01$),



as well as visceral adipose tissue ($r=-0.4$, $p=0.04$). *F. prausnitzii* negatively correlated with fasting glucose levels ($r=-0.3$, $p=0.04$). In patients with obesity, compared to patients with normal BMI, a decrease in the number of *C. leptum* group (9.0 ± 0.5 and 8.3 ± 1.0 , respectively, $p=0.019$) and the genus *Bifidobacterium* (6.8 ± 2.5 and 8.1 ± 0.8 , respectively, $p=0.016$) was observed.

Conclusion. Gut microbiota in polycystic ovary syndrome is characterized by a decrease in species richness and imbalance of microorganisms towards an increase in abundance of *C. perfringens*, *C. difficile*, *Staphylococcus* spp. and decrease in the colonization of symbionts (*Clostridium leptum* gr., *Prevotella* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Bacteroides* spp.), which maintain gut colonization resistance. The imbalance of gut microbiota is associated with the presence of excess adipose tissue and metabolic disorders.

Keywords: polycystic ovary syndrome (PCOS), intestinal microbiota, hyperandrogenism, metabolic disorders, PCR, obesity

■ ВВЕДЕНИЕ

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) – одно из самых распространенных эндокринных расстройств репродуктивной системы, встречающееся у 10–13% женщин [1]. Для СПКЯ характерны клиническая и/или биохимическая гиперандрогения (ГА), поликистозная трансформация яичников и нарушение овуляторной функции, что проявляется олигоменореей, андрогензависимой дерматопатией и ановуляторным бесплодием. У 30–50% пациенток с СПКЯ выявляются ожирение и метаболические нарушения, ассоциированные с сахарным диабетом (СД) 2-го типа и сердечно-сосудистыми осложнениями [2, 3]. Проведенные исследования (в том числе и в нашем центре) демонстрируют повышенную частоту метаболических расстройств даже у женщин с СПКЯ и нормальной массой тела [4–7]. При этом выявлена взаимосвязь частоты развития инсулинорезистентности (ИР) и нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) с избытком жировой ткани при нормальном индексе массы тела (ИМТ) [7].

В последние годы появляется все больше данных о влиянии дисбиоза кишечной микробиоты (КМ) на развитие ожирения, СД 2-го типа и метаболического синдрома (МС) [8–10]. Учитывая тесную связь СПКЯ с метаболическими нарушениями, было сделано предположение о роли изменений КМ в его патогенезе. Согласно концепции DOGMA (Dysbiosis of Gut Microbiota), дисбиоз может способствовать развитию ИР, гиперандрогении и нарушению фолликулогенеза через активацию иммунной системы вследствие хронического субклинического воспаления [11]. Ключевым аспектом этой теории является дисбаланс микроорганизмов, обеспечивающих кишечный гомеостаз и колонизационную резистентность. Предполагается, что избыточный рост условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) увеличивает проницаемость кишечной стенки, что способствует проникновению эндотоксина липополисахарида (ЛПС) – компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий – в системный кровоток. Это приводит к эндотоксемии и запуску иммунного ответа в виде выработки провоспалительных цитокинов адипоцитами (таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкин-6 (IL-6)), что способствует формированию хронического воспаления и ИР на пострецепторном уровне [11].

В литературе описано снижение альфа-разнообразия кишечной микробиоты у пациенток с СПКЯ, коррелирующее с гиперандрогенией и метаболическими расстройствами [12, 13], а также продемонстрировано взаимное влияние микробиоты и андрогенов [14, 15]. Однако к настоящему времени проведено ограниченное количество исследований по изучению состава КМ при СПКЯ, а их результаты остаются неоднозначными. В связи с этим было проведено исследование по изучению микробиоты кишечника и ее связи с эндокринно-метаболическими параметрами пациенток с СПКЯ, а также сравнению состава КМ пациенток с СПКЯ и здоровых женщин.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить состав микробиоты кишечника и ее связь с метаболическими параметрами пациенток с синдромом поликистозных яичников.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное исследование на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, оценка состава КМ была выполнена у 170 женщин: 140 – с СПКЯ (средний возраст – $24,7 \pm 4,8$ года, средний ИМТ – $25,3 \pm 5,1$ кг/м²), 30 – группы сравнения (средний возраст – $26,6 \pm 5,0$ года, средний ИМТ – $24,4 \pm 4,8$ кг/м²). В группе сравнения нормальный ИМТ имели 16/30 (53,3%) женщин, избыточную массу тела – 8/30 (26,7%), ожирение – 6/30 (20,0%). При СПКЯ нормальный ИМТ имели 93/140 (66,4%) пациенток, избыточную массу тела – 25/140 (17,8%), ожирение – 22/140 (15,7%).

СПКЯ был диагностирован согласно рекомендациям Европейского общества репродукции и эмбриологии человека и Американского общества репродуктивной медицины [16]. Группу сравнения составили 30 женщин репродуктивного возраста с регулярным менструальным циклом, без гормонально-ассоциированных нарушений функции репродуктивной системы, включая клинический гиперандрогенизм. Дополнительными критериями исключения для обеих исследуемых групп являлись:

- наличие некомпенсированных гастроэнтерологических заболеваний;
- некомпенсированные хронические воспалительные заболевания различной локализации и этиологии;
- острые воспалительные заболевания менее чем за 3 месяца до момента включения в исследование;
- невозможность сбора образцов фекалий;
- сахарный диабет 1-го и 2-го типа;
- прием гормонотерапии, терапии инсулиносенситайзерами, пробиотиками и антибиотиками за три месяца до проводимого исследования;
- беременность и лактация;
- отсутствие подписанного информированного согласия на участие в исследовании, одобренного этическим комитетом центра.

До момента включения в исследование пациенткам было проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование с последующей постановкой диагноза СПКЯ или его исключением, включающее:

- оценку характера менструального цикла (олиго-/аменорея);
- определение гормональных параметров на 2–3-и сут. спонтанного или индуцированного приемом прогестагенов менструального цикла (сывороточных



уровней антимюллера гормона (АМГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), общего тестостерона (Тобщ), протеина, связывающего стероидные гормоны (ПССГ) с расчетом индекса свободных андрогенов (ИСА), андростендиона, 17-гидроксипрогестерона (17-ОП), пролактина, тиреотропного гормона (ТТГ), а также глюкозы и инсулина плазмы крови натощак с расчетом индекса НОМА);

- выполнение ультразвукового исследования (УЗИ) органов малого таза с определением объема яичников и числа антральных фолликулов в объеме яичников в 3D-режиме (аппарат Toshiba SSA-240, Япония, трансвагинальный датчик частотой 8,0 МГц).

Оценка композиционного состава тела проводилась методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат фирмы Lunar (США)), определялись количество и характер распределения жировой ткани, включая висцеральную жировую ткань.

Изучение состава кишечной микробиоты проводилось молекулярно-биологическим методом ПЦР в режиме реального времени с помощью зарегистрированного в России набора реагентов (ЭНТЕРОФЛОР® Дети, Россия) для определения ДНК кишечного-ассоциированных микроорганизмов, учитывая наличие в составе набора всех необходимых для анализа микробиоты труднокультивируемых микроорганизмов (отделы Bacillota (Firmicutes), Pseudomonadota (Proteobacteria), Bacteroidota (Bacteroidetes), Actinomycetota (Actinobacteria), Fusobacteriota (Fusobacteria), Verrucomicrobiota (Verrucomicrobia), Euryarchaeota), в том числе грибов рода Candida, а также гена метициллинрезистентности *Staphylococcus* spp. (*mecA*), *C. difficile* с генами энтеротоксинов А и В (*tcdA*, *tcdB*), *S. agalactiae* с геном инвазивности (*srr2*).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью таблиц Microsoft Excel (Microsoft Office 2016) и программы MedCalc (MedCalc® Statistical Software, версия 22.013). Для количественных показателей рассчитаны средние значения и среднеквадратическое отклонение или медиана с интерквартильным размахом. Сравнение производилось с помощью t-критерия Стьюдента, теста Манна – Уитни или критерия χ^2 Пирсона. Корреляционный анализ проводился с помощью метода Пирсона или непараметрического критерия Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе показателей гормонального и метаболического профиля пациенток с СПКЯ биохимическая гиперандрогения выявлена у 111/140 (79,3%) пациенток, часто в виде сочетанного повышения уровней различных андрогенов (средние уровни Тобщ $1,76 \pm 0,67$ нмоль/л, андростендиона $17,61 \pm 6,7$ нмоль/л, ИСА $4,89 \pm 3,4\%$). Отмечалось значимое повышение уровня АМГ до $11,93 \pm 6,09$ нг/мл. Остальные исследуемые показатели гормонального профиля, такие как ЛГ, ФСГ, ТТГ, пролактин, 17-ОП, оставались в пределах референсных значений, что свидетельствует в пользу установленного диагноза и исключает другие достаточно распространенные причины олиго-аменореи. Оценка показателей углеводного обмена выявила НТГ у 23/140 (16,4%) пациенток, ИР и гиперинсулинемию – соответственно у 50/140 (35,7%) и у 58/140 (41,4%).

По данным денситометрии избыток жировой ткани диагностирован у 102/140 (72,9%) пациенток, среднее ее значение составило $36,27 \pm 5,8\%$. При избыточной массе тела и ожирении все пациентки имели избыток общей жировой ткани, средние значения – $45,2 \pm 2,8\%$ и $48,2 \pm 7\%$ ($p < 0,001$). При нормальной массе тела этот параметр составил $30,6 \pm 5,1\%$. У большинства из пациенток с нормальной массой тела (55/93 (59,1%)) выявлен избыток жировой ткани. У 62/93 (66,7%) из них присутствовал избыток ВЖТ, ее средняя масса составила $451,49 \pm 418,21$ г. Прямая корреляция массы ВЖТ выявлена с параметрами углеводного обмена – с инсулином натощак ($r = 0,528$, $p < 0,01$) и индексом НОМА ($r = 0,632$, $p < 0,01$).

Метод ПЦР в реальном времени позволил идентифицировать труднокультивируемые микроорганизмы, выявление которых затруднено методами культуромики. На первом этапе исследования была определена частота встречаемости 12 групп микроорганизмов у пациенток с СПКЯ и в группе сравнения, что представлено на рис. 1. Качественный анализ не выявил различий по частоте встречаемости микроорганизмов в группах СПКЯ и сравнения. Учитывая данные о метаболических и морфофункциональных характеристиках исследуемых бактерий, в дальнейшем они были условно разделены на потенциально полезные – симбионты и УПМ.

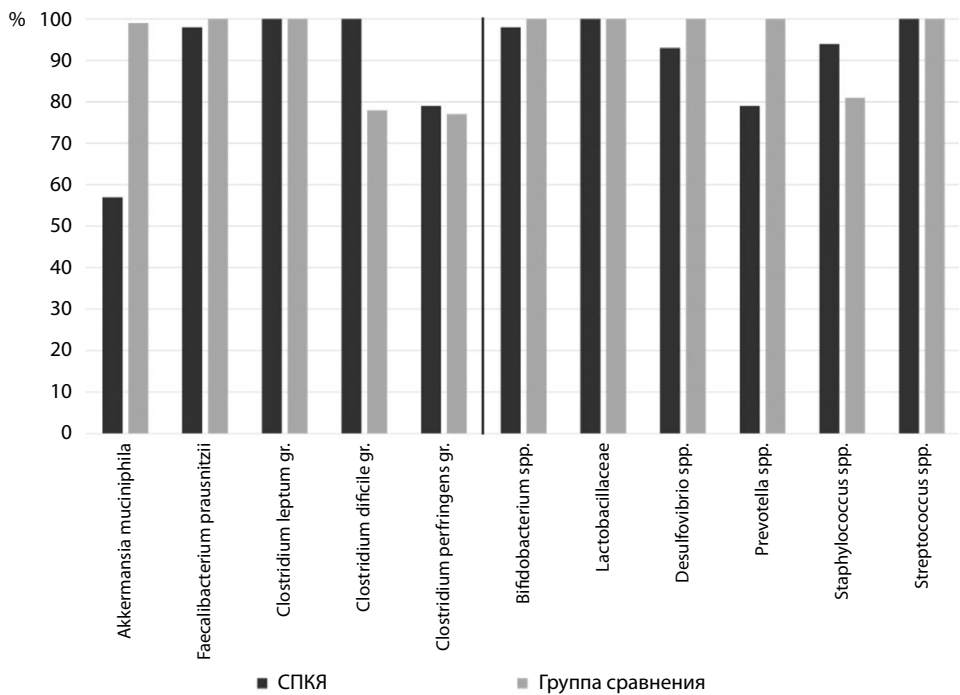


Рис. 1. Частота встречаемости основных групп микроорганизмов у пациенток с СПКЯ и в группе сравнения
Fig. 1. Frequency of occurrence of the main groups of microorganisms in patients with PCOS and in the comparison group

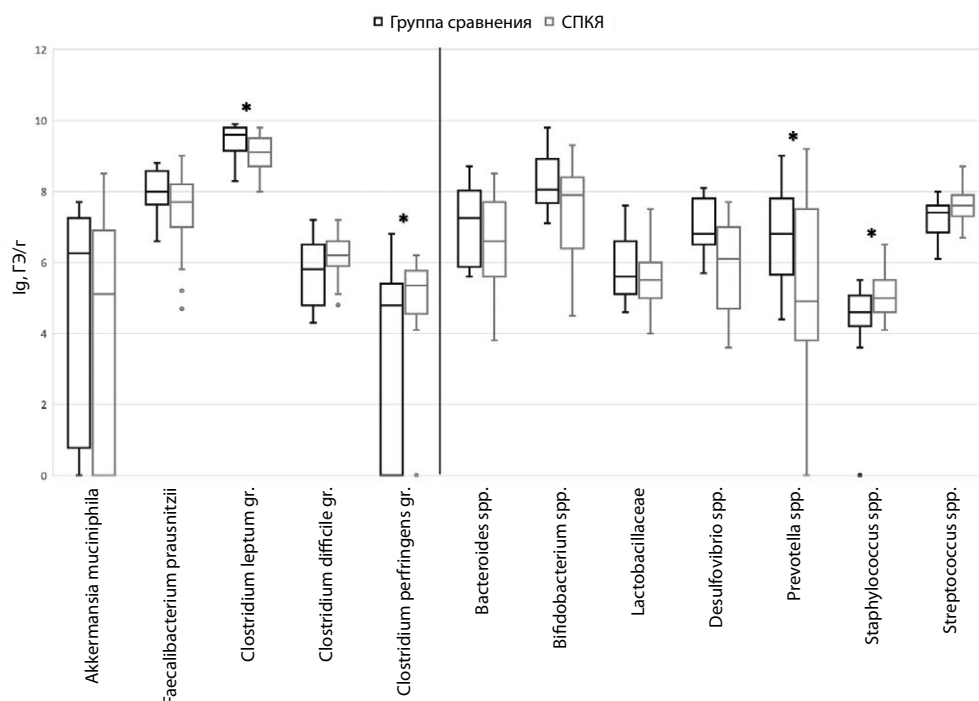


Рис. 2. Среднее количество микроорганизмов (ГЭ/г) в группе сравнения и СПКЯ
Fig. 2. Average number of microorganisms (GE/g) in the comparison group and PCOS

Помимо частоты встречаемости, был выполнен сравнительный анализ количества геном-эквивалентов (ГЭ) исследуемых микроорганизмов в группе СПКЯ и группе сравнения (рис. 2). При СПКЯ выявлено большее количество бактерий, относящихся к *Clostridium perfringens* gr. и *Staphylococcus* spp. (УПМ), тогда как в группе сравнения в более высоком титре присутствовали *Clostridium leptum* gr. и *Prevotella* spp. (участвуют в синтезе короткоцепочечных жирных кислот (КЖК)). Колонизационные показатели других симбионтов – *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Bacteroides* spp. – также имели тенденцию к снижению в группе СПКЯ в отличие от группы сравнения. Наряду с этим, при СПКЯ наблюдались более высокие титры УПМ: *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) и *Streptococcus* spp., хотя показатели не достигли статистической значимости ($p > 0,05$).

При проведении корреляционного анализа в группе СПКЯ выявлена статистически значимая прямая связь между показателем *C. perfringens* gr. и уровнем глюкозы в сыворотке крови натощак ($r = 0,3$, $p = 0,03$). Отрицательная корреляционная связь наблюдалась между количеством бактерий группы *Clostridium leptum* gr. и уровнем глюкозы натощак ($r = -0,4$, $p = 0,01$), а также массой висцеральной жировой ткани ($r = -0,4$, $p = 0,04$). Аналогичным образом наиболее многочисленный вид из группы *C. leptum* и *F. prausnitzii* отрицательно коррелировал с уровнем глюкозы натощак ($r = -0,3$, $p = 0,04$). Помимо этого, обнаружены корреляции между микроорганизмами,

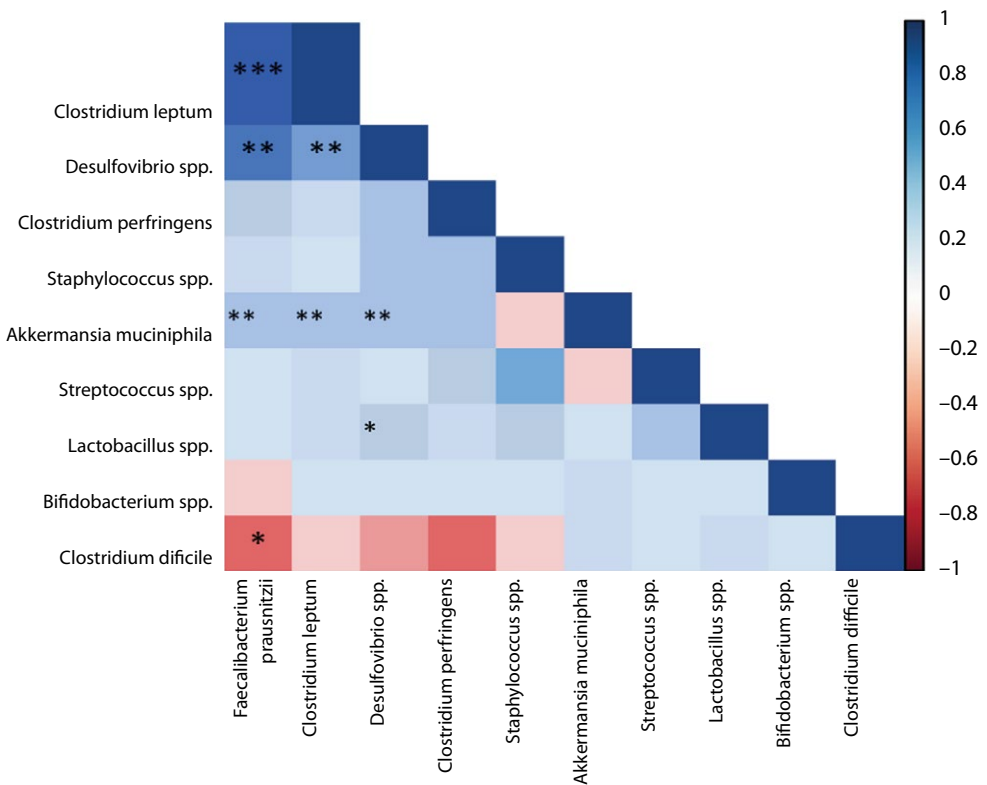


Рис. 3. Коррелограмма групп бактерий у пациенток с СПКЯ
Fig. 3. Correlogram of bacterial groups in patients with PCOS

в частности *Desulfovibrio* spp. с видом *F. prausnitzii* ($r=0,648$, $p<0,0001$) и группой *C. leptum* ($r=0,551$, $p<0,0001$), что может указывать на возможность симбиотического сосуществования этих бактерий (рис. 3). Корреляционных связей количества бактерий с андрогенным профилем выявлено не было.

При разделении пациенток на подгруппы в зависимости от ИМТ (нормальная масса тела, избыточная масса тела и ожирение) отмечено усугубление дисбаланса КМ в группе с ожирением по сравнению с нормальной массой тела. При избыточной массе тела по сравнению с нормальным ИМТ отмечалась тенденция к снижению количества бактерий группы *C. leptum* ($8,8\pm0,6$ и $9,0\pm0,5$ соответственно, $p=0,524$) и рода *Bifidobacterium* ($7,2\pm1,4$ и $8,1\pm0,8$ соответственно, $p=0,599$). При ожирении эта закономерность была более очевидна, показатели достигли статистической значимости по сравнению с пациентками с нормальным ИМТ ($9,0\pm0,5$ и $8,3\pm1,0$, $p=0,019$; $6,8\pm2,5$ и $8,1\pm0,8$, $p=0,016$, соответственно). Среди УПМ отличий между пациентками с нормальной и избыточной массой тела по количеству бактерий рода *Staphylococcus* не установлено, тогда как при ожирении их количество статистически значимо превышало таковое у пациенток с нормальным ИМТ ($4,7\pm1,6$ и $5,9\pm1,7$, $p=0,015$, соответственно) (рис. 4).

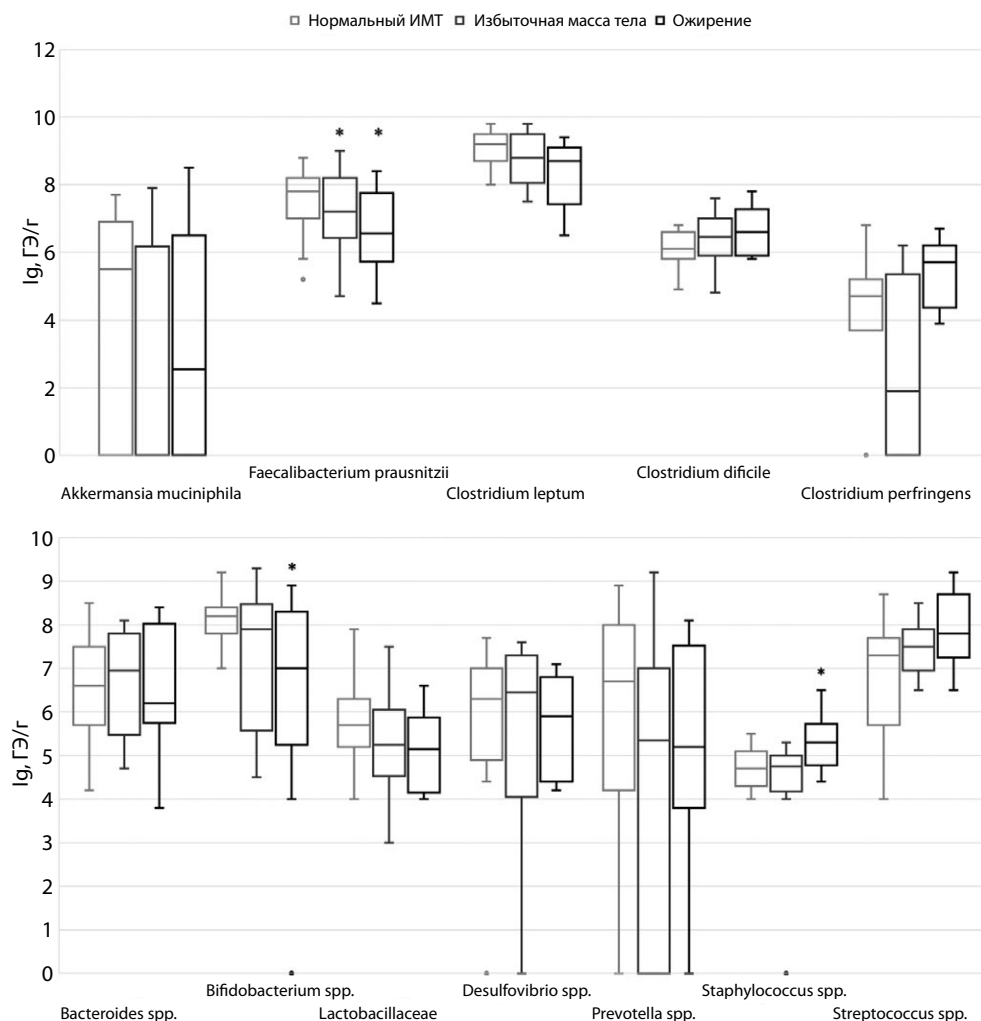


Рис. 4. Среднее количество микроорганизмов (ГЭ/г) в группе СПКЯ при нормальном ИМТ, избыточной массе тела и ожирении
Fig. 4. Average number of microorganisms (GE/g) in the PCOS group with normal BMI, overweight and obesity

Статистически значимых различий между группами пациенток с нормальным ИМТ при избытке жировой ткани и без него не выявлено по основным показателям, за исключением уровня *Clostridium leptum* gr., титр которой был достоверно выше при отсутствии у пациенток избытка жировой ткани и нормальном ИМТ ($7,9 \pm 0,6$ и $9,0 \pm 0,8$ соответственно, $p=0,04$). В этой группе пациенток отмечена отрицательная корреляция *Clostridium leptum* gr. с общим количеством жировой ткани ($r=-0,4$, $p=0,03$).

■ ОБСУЖДЕНИЕ

СПКЯ является социально значимой проблемой, затрагивающей эндокринные, репродуктивные, кардиометаболические, дерматологические и психологические аспекты [17]. СПКЯ рассматривают как репродуктивный метаболический синдром, поскольку частота встречаемости ожирения, ИР, НТГ, дислипидемии достигает 50% [7].

В последнее время большой научный интерес вызывает вопрос о взаимосвязи хронического субклинического воспаления (ХСВ) и метаболической дисфункции с нарушением состава КМ ввиду активного взаимодействия микроорганизмов с иммунной системой человека, синтезом ими биологически активных веществ, участвующих в регуляции обменных процессов. Хотя основные биологические функции микробиоты ассоциированы с ее локализацией, роль микроорганизмов выходит далеко за рамки конкретного биотопа. Так, КМ участвует не только в пищеварении, поддержании энергетического баланса и барьерной функции кишечника, но и в депонировании жиров, формировании кровеносных сосудов, регуляции нервной и иммунной системы, метаболизме лекарственных средств и др. [18, 19]. Устойчивое равновесие между КМ и организмом человека обеспечивает регуляцию гомеостаза и резистентность к различным патологиям. Нарушение стабильности КМ, обусловленное образом жизни или воздействием внешних факторов, может приводить как к воспалительным, так и к невоспалительным системным заболеваниям [20, 21]. Такие нарушения могут включать функциональные и композиционные изменения КМ и часто называются дисбиозом. Исследования показывают значительную гетерогенность профиля КМ при различных патологических состояниях. Помимо этого, в кишечнике человека присутствует несколько сотен видов бактерий, часть из которых имеет схожие функции, вследствие чего потеря одних может быть компенсирована другими, что интерпретируется как функциональная избыточность. Все это затрудняет поиск микроорганизмов, потенциально вовлеченных в патогенез или являющихся непосредственной причиной заболеваний, ассоциированных с метаболической дисфункцией, к числу которых относится СПКЯ.

Тем не менее, именно потерю функциональной избыточности вследствие снижения разнообразия микроорганизмов и/или различных изменений их состава связывают с развитием ожирения, метаболического синдрома и СД 2-го типа [22–24]. Многочисленные данные свидетельствуют об ассоциации снижения разнообразия КМ с инсулинорезистентностью и ожирением [25, 26]. Согласно полученным результатам, избыток массы тела и ожирение были ассоциированы со снижением числа симбиотных бактерий группы *Clostridium leptum* gr. и рода *Bifidobacterium*, а также увеличением численности УПМ рода *Staphylococcus*. Это также может указывать на взаимосвязь нарушений КМ с развитием СПКЯ и их усугубление при увеличении массы тела.

Предполагается, что снижение численности симбионтов приводит к сокращению синтеза КЖК, регулирующих обмен глюкозы, окисление ЖК и даже аппетит, а также желчных кислот, способствующих пищеварению и эмульгированию жиров, что может служить предпосылкой к развитию дислипидемии и инсулинорезистентности при СПКЯ [27]. В проведенном исследовании у пациенток с СПКЯ по сравнению со здоровыми женщинами отмечалась более низкая численность симбиотных бактерий (*Clostridium leptum* gr., *Prevotella* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Bacteroides* spp.).



Исследования показали, что бутират – одна из наиболее значимых КЖК, продуцируемых этими микроорганизмами, – может стимулировать секрецию кишечных гормонов, глюкагоноподобного пептида и пептида YY, которые играют важную роль в снижении уровня глюкозы в крови, способствуя секреции инсулина и чувству насыщения [28–30]. Кроме того, он поддерживает барьерную функцию кишечника [31], выработку муцина [32] и оказывает противовоспалительное действие [33], в связи с чем снижение численности продуцирующих его бактерий может вносить вклад в развитие ХСВ и ИР. Это подтверждается рядом исследований, обнаруживших более низкие титры *F. prausnitzii* (из группы *C. leptum*) и *A. muciniphila* у пациенток с СД 2-го типа и ожирением, а также и их обратную корреляцию с маркерами воспаления и ИР [34–36]. В одной из работ, где анализировались образцы фекалий 382 пациентов с ожирением, отрицательная взаимосвязь рода *Akkermansia* с уровнем глюкозы натощак оставалась статистически значимой даже при пересчете на пол, возраст, образ жизни и прием препаратов [37]. *A. muciniphila* – это бактерия, способная использовать муцин в качестве источника углерода, азота и энергии, продуцируя при этом ацетат и пропионат [38]. Полагается, что эти КЖК влияют на функцию β -клеток поджелудочной железы, усиливая секрецию инсулина и снижая уровень глюкозы в крови [39]. Помимо этого, в экспериментах на мышах был показан противовоспалительный эффект *A. muciniphila* в виде снижения уровня цитокинов и экспрессии генов воспаления [40].

Помимо снижения численности симбионтов, проявление дисбаланса КМ включает также чрезмерный рост УПМ, который может снижать экспрессию белков плотных соединений, увеличивать проницаемость кишечника и способствовать проникновению токсинов (в частности, ЛПС) в системный кровоток, где они активируют иммунную систему, вызывая хроническое субклиническое воспаление [11]. Считается, что у здоровых людей белки плотных соединений поддерживают целостность кишечного барьера, вследствие чего ЛПС не проходит в системный кровоток, и максимальная его концентрация наблюдается в просвете кишечника [41]. Показано, что проникновение ЛПС в кровоток, или «метаболическая эндотоксемия», ассоциировано с повышенной проницаемостью кишечника, вызванной нарушением состава КМ [42]. Связывающиеся в кровяном русле с ЛПС-связывающим белком и мембраносвязанным рецептором CD14 эндотоксины взаимодействуют с TLR4, влияя как на воспалительные, так и на инсулиновые сигнальные пути [43, 44], что в свою очередь индуцирует NF- κ B-опосредованное воспаление с последующим развитием ИР. Выявленная в данном исследовании большая частота обнаружения популяции условно-патогенных гамма-протеобактерий семейства Enterobacteriaceae и бета-протеобактерий, относящихся к порядку Burkholderiales, в сочетании с нарушением проницаемости клеточной стенки ЖКТ могут являться фактором, способствующим повышению продукции ЛПС. Кроме того, небольшие концентрации других энтеропатогенных токсинов, продуцируемых *C. difficile*, *C. perfringens* и *Streptococcus* spp., численность которых была повышена при СПКЯ, также могут способствовать развитию ХСВ. Хотя уровень бактериальных токсинов в сыворотке крови в данной работе не оценивался, они могут играть важную роль во взаимосвязи КМ с СПКЯ. Это позволяет предположить, что дисбаланс микробных сообществ кишечника, наряду с генетическими и эпигенетическими факторами, может являться дополнительной детерминантой развития метаболических нарушений и ожирения при СПКЯ.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

КМ при СПКЯ характеризуется сдвигом баланса микроорганизмов в сторону увеличения представителей УПМ (*C. perfringens*, *C. difficile*, *Staphylococcus* spp.), что может быть ассоциировано с хроническим субклиническим воспалением, избытком жировой ткани и формированием инсулинорезистентности на фоне снижения колонизационных показателей симбионтов (*Clostridium leptum* gr., *Prevotella* spp., *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Desulfovibrio* spp., *Bacteroides* spp.), продуцирующих КЖК и поддерживающих колонизационную резистентность кишечника. Дисбаланс кишечной микробиоты ассоциирован с наличием избытка жировой ткани и метаболическими нарушениями. Следует полагать, что коррекция состава КМ будет способствовать нормализации метаболических параметров, ассоциированных с развитием или усугублением гиперандрогении, в том числе ИР, – основных факторов нарушения фолликулогенеза и овуляторной дисфункции при СПКЯ.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Teede H., Deeks A., Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.*, 2010;8(1):41. doi: 10.1186/1741-7015-8-41
2. Tosi F., Bonora E., Moghetti P. Insulin resistance in a large cohort of women with polycystic ovary syndrome: a comparison between euglycaemic-hyperinsulinaemic clamp and surrogate indexes. *Hum. Reprod.*, 2017;32(12):2515–2521. doi: 10.1093/HUMREP/DEX308
3. Wekker V. et al. Long-term cardiometabolic disease risk in women with PCOS: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 2020;26(6):942–960. doi: 10.1093/HUMUPD/DMAA029
4. Moran L.J., Misso M.L., Wild R.A., Norman R.J. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 2010;16(4):347–363. doi: 10.1093/HUMUPD/DMQ001
5. Morgan C.L., Jenkins-Jones S., Currie C.J., Rees D.A. Evaluation of adverse outcome in young women with polycystic ovary syndrome versus matched, reference controls: a retrospective, observational study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012;97(9):3251–3260. doi: 10.1210/JC.2012-1690
6. Zhu S. et al. Metabolic disturbances in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2019;111(1):168–177. doi: 10.1016/J.FERTNSTERT.2018.09.013
7. Kirillova K.E.D., Vtorushina V.V.V., Krechetova K.L.V., et al. Excess adipose tissue and chronic subclinical inflammation in patients with polycystic ovary syndrome. *Akush. Ginekol. (Sofia)*, 2023;4: 2023:111–119. doi: 10.18565/aig.2023.56
8. Esteve E., Ricart W., Fernández-Real J.M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: Did gut microbiota co-evolve with insulin resistance? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2011;14(5):483–490. doi: 10.1097/MCO.0B013E328348C06D
9. Flint H.J. Obesity and the gut microbiota. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2011;45 Suppl, no. SUPPL. 3. doi: 10.1097/MCG.0B013E3281821F44C4
10. Tremaroli V., Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 2012;489(7415):242–249. doi: 10.1038/NATURE11552
11. Tremellen K., Pearce K. Dysbiosis of Gut Microbiota (DOGMA) – A novel theory for the development of Polycystic Ovarian Syndrome. *Med. Hypotheses*, 2012;79(1):104–112. doi: 10.1016/j.mehy.2012.04.016
12. Zhang F. et al. Diversity of the Gut Microbiota in Dihydrotestosterone-Induced PCOS Rats and the Pharmacologic Effects of Diane-35, Probiotics, and Berberine. *Front. Microbiol.*, 2019;10(FEB). doi: 10.3389/FMICB.2019.00175
13. Lindheim L. et al. Alterations in Gut Microbiome Composition and Barrier Function Are Associated with Reproductive and Metabolic Defects in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Pilot Study. *PLoS One*, 2017;12(1). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0168390
14. Insenser M., Murri M., Del Campo R., et al. Gut Microbiota and the Polycystic Ovary Syndrome: Influence of Sex, Sex Hormones, and Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2018;103(7):2552–2562. doi: 10.1210/JC.2017-02799
15. Sherman S.B. et al. Prenatal androgen exposure causes hypertension and gut microbiota dysbiosis. *Gut Microbes*, 2018;9(5):400–421. doi: 10.1080/19490976.2018.1441664
16. Polycystic ovary syndrome. Clinical guidelines. Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow, 2025. (In Russ.)
17. March W.A., Moore V.M., Willson K.J., et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum. Reprod.*, 2010;25(2):544–551. doi: 10.1093/HUMREP/DEP399
18. Huttenhower C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012;486(7402):207–214. doi: 10.1038/NATURE11234
19. Macfarlane G.T., Macfarlane S. Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 1997;222(sup222):3–9. doi: 10.1080/00365521.1997.11720708
20. Ferreira C.M., Vieira A.T., Vinolo M.A.R., et al. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J. Immunol. Res.*, 2014;2014. doi: 10.1155/2014/689492
21. Quigley E.M.M. Basic Definitions and Concepts: Organization of the Gut Microbiome. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2017;46(1):1–8. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.002
22. Le Chatelier E. et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 2013;500(7464):541–546. doi: 10.1038/NATURE12506



23. Lim M.Y. et al. The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, 2017;66(6):1031–1038. doi: 10.1136/GUTJNL-2015-311326
24. Walters W.A., Xu Z., Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.*, 2014;588(22):4223–4233. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.039
25. Chen Z. et al. Association of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes With Gut Microbial Diversity: A Microbiome-Wide Analysis From Population Studies. *JAMA Netw. open*, 2021;4(7). doi: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2021.18811
26. Zouliouch S. et al. Markers of metabolic health and gut microbiome diversity: findings from two population-based cohort studies. *Diabetologia*, 2021;64(8):1749–1759. doi: 10.1007/S00125-021-05464-W
27. Zhao X., Jiang Y., Xi H., et al. Exploration of the Relationship Between Gut Microbiota and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): a Review. *Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 2020;80(2):161–171. doi: 10.1055/A-1081-2036
28. Christiansen C.B., Gabe M.B.N., Svendsen B., et al. The impact of short-chain fatty acids on GLP-1 and PYY secretion from the isolated perfused rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2018;315(1):G53–G65. doi: 10.1152/AJPGI.00346.2017
29. Tolhurst G. et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 2012;61(2):364–371. doi: 10.2337/DB11-1019
30. Yadav H., Lee J.H., Lloyd J., et al. Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *J. Biol. Chem.*, 2013;288(35):25088–25097. doi: 10.1074/jbc.M113.452516
31. Matheus V.A., Monteiro L.C.S., Oliveira R.B., et al. Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice. *Exp. Biol. Med.*, 2017;242(12):1214–1226. doi: 10.1177/1535370217708188
32. Liang L. et al. Gut microbiota-derived butyrate regulates gut mucus barrier repair by activating the macrophage/WNT/ERK signaling pathway. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2022;136(4):291–307. doi: 10.1042/CS20210778
33. Pedersen S.S., Prause M., Williams K., et al. Butyrate inhibits IL-1 β -induced inflammatory gene expression by suppression of NF- κ B activity in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.*, 2022;298(9). doi: 10.1016/j.jbc.2022.102312
34. Teixeira T.F.S., Grześkowiak Ł.M., Salminen S., et al. Faecal levels of Bifidobacterium and Clostridium coccoides but not plasma lipopolysaccharide are inversely related to insulin and HOMA index in women. *Clin. Nutr.*, 2013;32(6):1017–1022. doi: 10.1016/j.clnu.2013.02.008
35. Furet J.P. et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss: Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes*, 2010;59(12):3049. doi: 10.2337/DB10-0253
36. Tabasi M. et al. Gut Microbiota and Serum Biomarker Analyses in Obese Patients Diagnosed with Diabetes and Hypothyroid Disorder. *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, 2021;19(3):144–151. doi: 10.1089/MET.2020.0119
37. Zhong X., Harrington J.M., Millar S.R., et al. Gut Microbiota Associations with Metabolic Health and Obesity Status in Older Adults. *Nutrients*, 2020;12(8):2364. doi: 10.3390/NU12082364
38. Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., et al. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004;54(Pt 5):1469–1476. doi: 10.1099/IJS.0.02873-0
39. Blaak E.E. et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef. Microbes*, 2020;11(5):411–455. doi: 10.3920/BM2020.0057
40. Raftar S.K.A. et al. The anti-inflammatory effects of Akkermansia muciniphila and its derivatives in HFD/CCL4-induced murine model of liver injury. *Sci. Rep.*, 2022;12(1):1–14. doi: 10.1038/S41598-022-06414-1
41. Guo S., Nighot M., Al-Sadi R., et al. Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *J. Immunol.*, 2015;195(10):4999–5010. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1402598
42. Garibotto G., Carta A., Picciotto D., et al. Toll-like receptor-4 signaling mediates inflammation and tissue injury in diabetic nephropathy. *J. Nephrol.*, 2017;30(6):719–727. doi: 10.1007/S40620-017-0432-8
43. Cox A.J. et al. Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Metab.*, 2017;43(2):163–166. doi: 10.1016/j.diabet.2016.09.004
44. Laugerette F. et al. Overfeeding increases postprandial endotoxemia in men: Inflammatory outcome may depend on LPS transporters LBP and sCD14. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2014;58(7):1513–1518. doi: 10.1002/MNFR.201400044



Мокаева А.А.^{1, 2}✉, Хараева З.Ф.²

¹ ООО «Педиатрический центр "Сабиклиника"», Нальчик, Россия

² Кабардино-Балкарский государственный университет имени Х.М. Бербекова, Нальчик, Россия

Клинико-лабораторные особенности проявления респираторной микоплазменной инфекции у детей в Кабардино-Балкарской Республике в 2024 году

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Мокаева А.А. – сбор, обработка материала, написание текста, анализ полученных данных; Хараева З.Ф. – научное редактирование.

Информированное согласие: авторы имеют подписанное информированное согласие законных представителей пациентов на анонимное опубликование их данных в медицинском издании.

Финансирование: исследование проведено за счет средств ООО «Педиатрический центр "Сабиклиника"». Финансовой поддержки со стороны компаний – производителей лекарственных препаратов и медицинского оборудования авторы не получали.

Благодарность: авторы выражают благодарность главному внештатному специалисту-эпидемиологу Минздрава Кабардино-Балкарской Республики Петровой М.П., а также кандидату химических наук, заведующей научно-исследовательской лабораторией разработки систем доставки лекарственных препаратов Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии Морозкиной С.Н.

Подана: 08.05.2025

Принята: 31.10.2025

Контакты: alima.mokaieva@mail.ru

Резюме

Введение. В период с октября по декабрь 2024 года в Кабардино-Балкарской Республике (КБР) отмечались вспышки атипичной пневмонии и бронхитов, ассоциированных с *Mycoplasma pneumoniae*. Кабардино-Балкарская Республика – край с довольно теплым климатом, поэтому случаи пневмонии у детей начинают обследовать более углубленно лишь при отсутствии значимой положительной динамики, спустя 5–7 суток от назначенного лечения, либо при позднем обращении. Ввиду относительно большого (по сравнению с другими регионами) процента непривитых детей в последние годы вспышки различных инфекций в республике наблюдаются часто. В статье рассматриваются клинические случаи микоплазменной инфекции дыхательных путей различного уровня локализации у детей в КБР, а также описываются протоколы лечения в амбулаторных условиях.

Цель. Изучить особенности клинических проявлений и данных лабораторных показателей крови у детей разного возраста при респираторной микоплазменной инфекции разной степени тяжести в Кабардино-Балкарской Республике.

Материалы и методы. Поперечное когортное исследование с анализом клинико-лабораторных особенностей течения респираторного микоплазмоза у обратившихся за медицинской помощью детей разного возраста, разделенных по уровню поражения дыхательного тракта. Дети также были разделены на 3 основные группы по возрастам: 2–4 года, 5–10 лет, 11–14 лет. Все пациенты осмотрены физикально, выполнена обзорная рентгенография органов грудной клетки (в группе с клиническими проявлениями пневмонии), в том числе и рентгенологический контроль после



проведенного лечения. Осуществлялось определение ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в мокроте и соскобах из ротовой полости и выполнение общего анализа крови в день первичного обращения и после достижения клинического выздоровления.

Результаты. Все случаи обращения с подтвержденным микоплазменным поражением дыхательных путей пролечены в амбулаторном порядке. Исследование показало, что неосложненная (в том числе с двусторонним поражением легких) микоплазменная пневмония поддается лечению в амбулаторных условиях, а также в условиях дневного стационара. Из общего числа обратившихся с клиническими проявлениями микоплазменной инфекции дыхательных путей пневмония выявлена у 44,5% лиц (40 детей). Микоплазменный бронхит диагностирован в 51,8% случаев (у 43 детей). Установлено отсутствие значимой воспалительной реакции со стороны крови независимо от возраста ребенка и уровня поражения дыхательной системы. В 2024 году заболеваемость детей этой бактериальной пневмонией была в 12,1 раза выше, чем в аналогичный период 2023 года. Необходимо отметить, что возрастные группы детей и объем выполненного обследования были такими же, что и в 2024 году. Основным диагностическим стандартом диагностики микоплазменной природы пневмонии и бронхитов у детей был метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Заключение. Поражение нижних дыхательных путей, вызванное *Mycoplasma pneumoniae*, у 75% обратившихся протекало по типу очаговой пневмонии. Средний возраст детей, на который приходились пневмонии, колебался в диапазоне 4–14 лет. Поражение дыхательных путей *Mycoplasma pneumoniae*, независимо от уровня и тяжести течения, не сопровождалось значимыми изменениями показателей общего анализа крови: не было выявлено увеличения количества лейкоцитов, лейкоцитарная формула оставалась без значимых сдвигов, показатели СОЭ и СРБ в крови не выходили за пределы нормы. Среднее время элиминации возбудителя на фоне проводимой комплексной терапии составляло 5–7 суток (по данным контрольных ПЦР в динамике). Среднее время выздоровления, по данным рентгенологической картины в легких, составляло 7–9 суток. Двое детей сохраняли рентгенологическую картину поражения в легких более 14 суток при отсутствии значимой клинической симптоматики.

Ключевые слова: микоплазменная инфекция, дети, общий анализ крови, респираторный микоплазмоз, атипичная пневмония, микоплазменный бронхит

Mokaeva A.^{1,2}✉, Kharaeva Z.²

¹ Sabyclinica Pediatric Center LLC, Nalchik, Russia

² Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov, Nalchik, Russia

Clinical and Laboratory Features of Respiratory Mycoplasma Infection Manifestation in Children in the Kabardino-Balkarian Republic in 2024

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Mokaeva A. – material collection and processing, text writing, analysis of the data obtained; Kharaeva Z. – scientific editing.

Informed consent: the authors obtained signed informed consents from the patients' legal representatives for anonymous publication of their data in a medical journal.

Funding: the study was conducted at the expense of the Sabyclinica Pediatric Center LLC. The authors did not receive financial support from manufacturers of medicines and medical equipment.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to M. Petrova, Chief Freelance Epidemiologist of the Ministry of Health of the Kabardino-Balkarian Republic, as well as to S. Morozkina, PhD in Chemistry, Head of the Research Laboratory for Drug Delivery Systems Development at the St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology.

Submitted: 08.05.2025

Accepted: 31.10.2025

Contacts: alima.mokaeva@mail.ru

Abstract

Introduction. In the period from October to December 2024, outbreaks of SARS and bronchitis associated with *Mycoplasma pneumoniae* were reported in the Kabardino-Balkarian Republic. The Kabardino-Balkarian Republic is a region with a fairly warm climate, therefore, cases of pneumonia in children begin to be examined more thoroughly only in the absence of significant positive changes, within 5–7 days after the prescribed treatment, or in cases of late treatment initiation. Due to the relatively large percentage of unvaccinated children (compared to other regions), outbreaks of various infections have been common in the republic in recent years. The article discusses clinical cases of mycoplasma infection of the respiratory tract at various levels of localization in children in KBR, as well as describes treatment protocols in outpatient settings.

Purpose. To study features of clinical manifestations and laboratory blood parameters in children of different ages with respiratory mycoplasma infection of varying severity in the Kabardino-Balkarian Republic.

Materials and methods. A cross-sectional cohort study was conducted to analyze clinical and laboratory features of respiratory mycoplasmosis in children of different ages who addressed for medical care, stratified by the level of respiratory tract involvement. The children were also divided into 3 main age groups (2–4 years old, 5–10 years old, and 11–14 years old). All patients were examined physically, an overview chest X-ray was performed (in the group with clinical manifestations of pneumonia), including X-ray monitoring after treatment, determination of *Mycoplasma pneumoniae* DNA in sputum, and general blood test on the day of the treatment initiation and after achieving clinical recovery.

Results. All cases of confirmed mycoplasma infection of the respiratory tract were treated in outpatient settings. The study showed that uncomplicated (including bilateral lung involvement) mycoplasma pneumoniae responds to treatment both in outpatient

settings and in day care facilities. Of the total number of patients who presented with clinical manifestations of mycoplasma infection of the respiratory tract, pneumonia was detected in 44.5% of cases (40 children). Mycoplasma bronchitis was diagnosed in 51.8% of cases (43 children). No significant inflammatory response was found in the blood, regardless of children age and level of respiratory system involvement.

Conclusion. Lower respiratory tract damage caused by *Mycoplasma pneumoniae* in 75% of patients presented as focal pneumonia. The average age of children with pneumonia ranged from 4 to 14 years. *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection, regardless of its severity, was not accompanied by significant changes in complete blood count parameters: no increase in white blood cell count was detected, the white blood cell formula remained almost unchanged, and ESR and CRP did not exceeded normal limits. The average time for pathogen elimination with comprehensive therapy was 5–7 days (based on PCR data follow-up over time). The average recovery time, according to X-ray picture of the lungs, was 7–9 days. Two children still show X-ray evidence of lung damage for more than 14 days in the absence of significant clinical symptoms.

Keywords: mycoplasma infection, children, general blood test, respiratory mycoplasmosis, SARS, mycoplasma bronchitis

■ ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире регистрируется высокая смертность детей от пневмоний различной этиологии. По данным ВОЗ, в 2015 г. от пневмонии умерли 920 136 детей в возрасте до 5 лет, что составляет 15% всех случаев смерти детей этого возраста [1].

К факторам, определяющим тяжесть течения инфекционного заболевания, относят: состояние иммунной системы пациента, неконтролируемый прием антибиотиков, особенности возбудителя, а также экологические и социальные факторы [2]. Доля микоплазменной инфекции среди заболеваний респираторного тракта, по данным различных авторов, колеблется от 4,9 до 67%. При эпидемических подъемах число заболевших микоплазмозом увеличивается до 20–40% к общему числу в структуре других респираторных инфекций [3]. У детей в возрасте старше 5 лет *Mycoplasma pneumoniae* выявляется в большом (до 40%) количестве случаев среди всех случаев воспаления дыхательных путей [3]. Микоплазменная пневмония контагиозна, подъем заболеваемости отмечается поздней осенью и в начале зимы, возможны вспышки в организованных коллективах. В крупных городах инфекции, вызванные *Mycoplasma pneumoniae*, встречаются на протяжении всего года. В 2012 году было зафиксировано 12 вспышек микоплазменной пневмонии на территории Российской Федерации [4].

Сложность лечения инфекции, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, состоит в структурной особенности микроорганизма. Микоплазмы, как и хламидии, относят к атипичным микроорганизмам из-за ряда их свойств, и прежде всего ввиду отсутствия ригидной клеточной стенки, что обуславливает полиморфизм клеток и, как следствие, устойчивость к антибактериальным средствам, подавляющим синтез клеточной стенки (в первую очередь к β -лактамным антибиотикам), и склонность ко внутриклеточной паразитарной локализации, что позволяет им избегать активного иммунного ответа и длительно персистировать в организме. Также для них

характерен малый размер генома, определяющий ограниченность биосинтетических возможностей и высокие требования к условиям культивирования; способность паразитировать на мембране эукариотической клетки и длительно персистировать в организме человека [5]. Небольшой размер патогенов позволяет преодолевать слизистые барьеры дыхательных путей, сливаться с клетками хозяина и выживать внутриклеточно на фоне антибиотикотерапии, что приводит к латентному, хроническому течению микоплазменной инфекции [6, 7]. Устойчивость к антибиотикам, действующим на клеточную стенку бактерий, обусловлена отсутствием подобной структуры у *Mycoplasma pneumoniae* [6, 7]. Судя по информации, представленной в доступной литературе, в настоящее время нет разработанных клинических рекомендаций по стандартам диагностики и определению клинических критериев микоплазменной инфекции дыхательных путей у детей. В связи с резким увеличением доли атипичных пневмоний в структуре внебольничных пневмоний возникла необходимость актуализации клинических и лабораторных критериев их диагностики и лечения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить особенности клинических проявлений и данных лабораторных показателей крови у детей разного возраста при респираторной микоплазменной инфекции разной степени тяжести в Кабардино-Балкарской Республике.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего обследованы 83 ребенка в возрасте от 2 до 14 лет (42 мальчика и 41 девочка) с клиникой поражения средних и нижних дыхательных путей. Дети были разделены на 2 группы в зависимости от уровня поражения дыхательных путей. Первая группа в количестве 43 детей (мальчиков 21, девочек 22) наблюдалась с диагнозом «J 20.0 Бронхит, вызванный *Mycoplasma pneumoniae*», вторая группа в количестве 40 детей (из них мальчиков 17, девочек 23) – с диагнозом «J 15.7 Острая внегоспитальная пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae*». Эти диагнозы были выставлены на основании клинической картины заболевания, данных рентгенологического исследования органов грудной клетки, определения ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в соскобе из ротовой полости при откашливании и в мокроте в день первичного обращения, а также на 5–7-е сутки заболевания в динамике. Все дети были разделены на возрастные группы: 2–4 года (мальчиков 10, девочек 12); 5–11 лет (мальчиков 24, девочек 21), 12–14 лет (мальчиков 7, девочек 9).

Исследуемые группы детей отбирались без патологии со стороны эритроидно-мегакариоцитарного ростка, что тоже могло отразиться на выраженности иммунного ответа.

Во всех случаях обращения дети были пролечены амбулаторно, в условиях дневного стационара педиатрического центра ООО «Сабиклиника» (г. Нальчик). Детям выполнена обзорная рентгенография органов грудной клетки, проведено исследование мокроты на определение в режиме реального времени ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae* (прибор «ДТ прайм», модификация М, изг. группа компаний «ДНК Технология», РФ, наборы реагентов – группа компаний «ДНК Технология» и АО «Вектор Бест») в день первичного обращения, а также в динамике на 5–7-е сутки после проводимой терапии. Мокрота, получаемая при откашливании, а также соскобы из ротовой полости объемом



1,0–1,5 мл для ПЦР-исследования забирались в стерильный пластиковый контейнер (изг. ООО «Комбитек пластик») объемом 30,0 мл. Также детям выполнялся общий анализ крови (выполнен на автоматическом гематологическом анализаторе Mindray BC-5150). Комплексная антибактериальная терапия состояла в назначении комбинации цефалоспоринов 2-го поколения парентерально в сочетании с приемом внутрь антибиотиков макролидного ряда (азитромицина, кларитромицина, рокситромицина), в использовании комбинированного препарата гиалуроновой кислоты и гипертонического раствора натрия хлорида в качестве небулайзерной терапии.

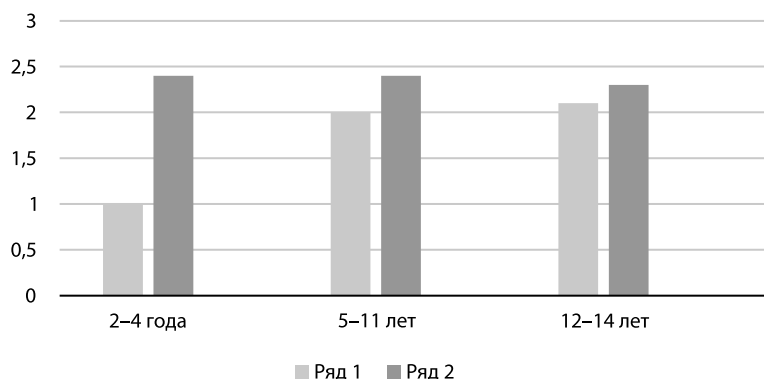
Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением программы Statist 15.3. Расчет данных производился с доверительной вероятностью 0,95.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Пневмонии различной этиологии из общего числа обратившихся за медицинской помощью составили 37% (40 детей). Доля поражений легочной ткани, вызванных *Mycoplasma pneumoniae*, составила 76% (30 детей) от общего числа пациентов с клиническими проявлениями и рентгенологическими данными, подтверждающими поражение легочной ткани. 5 детей (14% от общего числа пациентов) были с пневмониями, ассоциированными со *Streptococcus pneumoniae*, 3% обращений (1 ребенок) были связаны со смешанной флорой, и 7% (3 ребенка) пациентов показали положительный результат при определении ДНК *Chlamydia pneumoniae*.

95% пациентов (78 детей) обратились за медицинской помощью на 4–5-е сутки заболевания. Двое детей сохраняли рентгенологическую картину поражения в легких более 14 суток при отсутствии значимой клинической симптоматики.

По результатам проведенного исследования выявлено, что с клиникой поражения дыхательных путей, вызванного *Mycoplasma pneumoniae*, в виде воспаления легочной паренхимы обращались за помощью дети в возрастном диапазоне от 5 до 11 лет (73%). Распределение детей по тяжести поражения дыхательных путей представлено на рисунке.



Распределение детей по тяжести поражения дыхательных путей в разных возрастных группах (ряд 1 – микоплазменная пневмония, ряд 2 – микоплазменный бронхит)
Distribution of children in different age groups by severity of respiratory tract damage (row 1 – mycoplasma pneumoniae, row 2 – mycoplasma bronchitis)

81% пациентов (68 детей) были без признаков интоксикации и симптомов декомпенсации. Основная жалоба, присутствовавшая у 98% пациентов (у 84 детей), – малопродуктивный кашель.

Сравнительная оценка общего анализа крови, постановка которого была осуществлена в день первичного обращения детям различных возрастных групп от 2 до 14 лет с рентгенологически и клинически подтвержденным диагнозом острой внегоспитальной односторонней пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, представлена в табл. 1.

По результатам анализов крови необходимо отметить, что наиболее выраженная реакция на инфекционный агент отмечена в возрастной группе детей 12–14 лет в виде максимальных (сравнительно с показателями у детей других возрастов) цифр уровня лейкоцитов. В этом же возрастном диапазоне наблюдаются самые высокие цифры количества нейтрофилов как базового показателя борьбы с микробной инфекцией. Дети среднего возраста (от 5 до 11 лет) имели практически одинаковые показатели уровня лимфоцитов и моноцитов в крови. Скорость оседания эритроцитов у представителей всех исследуемых возрастных групп, а также групп по тяжести течения не поднималась выше 10 мм/ч.

Также сравнивались показатели общего анализа крови детей разного возраста с клиникой бронхита, вызванного *Mycoplasma pneumoniae*. Результаты выполненного сравнительного анализа представлены в табл. 2.

Таблица 1
Показатели общего анализа крови детей с микоплазменной пневмонией в разных возрастных группах
Table 1
Findings of the general blood test of children with mycoplasma pneumoniae in different age groups

Возраст (лет)	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, 10 ⁹ /л	Базофилы, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч
2–4, n=5	7,3±0,5	57,7±2	33,4±2	7,3±0,4	1,6±0,1	0±0,01	4,5±0,4	124±5,0	302±15,7	6±3,0
5–11, n=29	7,0±2,3	61,5±5	30,9±4,2	7,1±0,1	1,9±0,5	0,6±0,3	4,2±0,2	130±0,2	309±3,4	4±2,0
12–14, n=6	9,8±2,0	68,1±7	26±3,2	3,8±3,3	0,2±0,2	0±0,01	5,6±0,4	152±21	209±13,7	10±2,0

Таблица 2
Показатели общего анализа крови у детей с микоплазменным бронхитом
Table 2
Findings of the general blood test in children with mycoplasma bronchitis

Возраст (лет)	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, 10 ⁹ /л	Базофилы, 10 ⁹ /л	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч
2–4, n=10	12,1±2,9	62,9±6,2	30,8±3,7	4,8±1,5	1,5±1	0±1	4,2±1,4	115±11	350±39	8±5,0
5–11, n=15	4,6±3,9	57,4±3,4	35,0±2,9	6,8±4,8	0±0	0±0,5	5,09±3,9	145±10	137±13	5±3,0
12–14, n=18	9,8±5,9	68,1±30	26,0±13	3,8±1,5	2,1±1	0±0	5,5±2,2	150±18	209±23	7±4,0

Исходя из полученных результатов анализов крови детей с микоплазменным бронхитом, необходимо отметить, что наиболее выраженная реакция на инфекцию отмечена в возрастной группе 2–4 года. Остальные показатели оставались без значимых отклонений от нормы.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Судя по полученным результатам выполнения общего анализа крови, наиболее выраженная реакция на инфекционный агент отмечается в возрастной группе детей с микоплазменной пневмонией в возрасте 12–14 лет в виде максимальных (сравнительно с показателями у детей других возрастов) цифр уровня лейкоцитов. В этом же возрастном диапазоне наблюдаются самые высокие цифры количества нейтрофилов как базового показателя борьбы с микробной инфекцией. У детей среднего возраста от 5 до 11 лет выявлены практически одинаковые показатели уровня лимфоцитов и моноцитов в крови. Скорость оседания эритроцитов детей всех исследованных возрастных групп и групп пациентов с разной степенью тяжести течения не поднималась выше 10 мм/ч (табл. 1). Во второй исследуемой группе детей с микоплазменным бронхитом также отмечено отсутствие значимой воспалительной реакции со стороны крови (табл. 2). В возрастном диапазоне 2–4 года в группе с микоплазменным бронхитом обнаружена максимальная реакция со стороны общего количества лейкоцитов.

По данным Центра гигиены и эпидемиологии в Кабардино-Балкарской Республике, всего в 2024 году по ноябрь включительно зарегистрировано 73 случая бактериальных пневмоний среди детей до 17 лет (данные статистики Центра эпидемиологии по КБР за 2022–2023 годы по заболеваемости среди населения Кабардино-Балкарской Республики) [8]. Это в 12,1 раза больше подтвержденных ПЦР-методом случаев бактериальных пневмоний, чем за 2023 год.

На долю микоплазменных пневмоний из этого числа приходилось 39 случаев. Судя по клиническим данным, отсутствовали значимые признаки интоксикации (высокая лихорадка, снижение аппетита, ухудшение самочувствия и пр.). Необходимо отметить тотальное отсутствие выраженной воспалительной реакции со стороны крови (лейкоцитоза, сдвига лейкоцитарной формулы, подъема СОЭ) во всех исследуемых группах детей. Наиболее выраженная реакция на инфекционный агент наблюдалась в возрастной группе детей 12–14 лет в виде максимальных (сравнительно с показателями у детей других возрастов) цифр уровня лейкоцитов.

Отдельно необходимо отметить решающую роль в выявлении этиологии заболевания методов определения и выделения ДНК возбудителя в очаге воспаления. Исследование позволило подобрать необходимое этиотропное лечение.

В педиатрической практике чаще наблюдается постепенное начало микоплазменной пневмонии. В первые сутки появляются жалобы на вялость, сонливость ребенка при нормальных цифрах температуры тела. Отмечаются катаральные явления: боль при глотании, заложенность носа и слизистое отделяемое из носа. Ребенка могут беспокоить болезненные ощущения в мышцах и области поясницы. Однако наиболее ярким клиническим симптомом при микоплазменной инфекции является сухой, приступообразный, интенсивный кашель. Нередко пациенты жалуются на боль за грудиной во время кашля. Такое проявление респираторного микоплазмоза по типу острой респираторной инфекции может продолжаться 2–4 недели, а иногда

и дольше [9, 10]. По данным рентгенографии легких, в 54% случаев пневмония носила односторонний характер. У 57,5% пациентов негетерогенная инфильтрация локализовалась слева. Поражение одного сегмента визуализировали у 54,2% обследованных детей [11].

В группе исследуемых пациентов с верифицированным поражением легочной ткани одностороннее поражение отмечено в 90% случаев (36 детей, из них 17 мальчиков и 19 девочек). У 75% (30 детей) по данным рентгенологического заключения диагностировано очаговое поражение легочной ткани.

В литературе приводятся данные об этиотропной терапии микоплазменной инфекции с применением антибактериальных препаратов из группы макролидов и азалидов, к которым наиболее чувствительны микоплазмы: азитромицин (внутрь 10 мг/кг/сутки), джозамицин (внутрь 30–50 мг/кг в 3 приема в сутки), кларитромицин (внутрь 7,5–15 мг/кг в 2 приема в сутки), рокситромицин (внутрь 5–8 мг/кг в 2 приема в сутки), клиндамицин (внутрь 10–25 мг/кг в 3 приема в сутки или в/в, в/м 20–40 мг/кг в сутки, не более 3 г/сутки), мидекамицин (внутрь 30–50 мг/кг в 2–3 приема в сутки). Продолжительность антибиотикотерапии составила от 7 до 21 суток и зависела от тяжести и остроты болезни [12].

Отличие предлагаемого протокола лечения состоит в отказе от использования гормональной терапии, в комбинации антибактериальных препаратов макролидного и цефалоспоринового ряда, в применении комбинированного препарата гиалуроновой кислоты и гипертонического раствора натрия хлорида в качестве небулайзерной терапии. На фоне проводимой терапии на 4–5-е сутки отмечалось улучшение состояния в виде увлажнения и урежения эпизодов приступообразного кашля, купирования лихорадки. Рокситромицин может быть использован в качестве монотерапии для лечения микоплазменного поражения средних дыхательных путей, однако факт наличия возрастного ограничения (с 12 лет) существенно влияет на частоту его применения.

Представляем несколько клинических случаев из практики лечения микоплазменной инфекции дыхательных путей.

1. Девочка М., 10 лет, обратилась с жалобами на подъем температуры тела в течение первых 7 суток, выраженный приступообразный кашель, слабость, сонливость. Родители привели ребенка уже частично обследованного, с данными рентгенографического исследования, выполненного за несколько часов до обращения. При осмотре умеренно выраженные явления периферического акроцианоза, интоксикации. Аускультативно наблюдали клинику внегоспитальной верхнедолевой очаговой правосторонней пневмонии.

Данные общего анализа крови в день обращения и после выздоровления представлены в табл. 3.

Определение уровня СРБ крови в день обращения – отрицательно.

Определение ДНК *Mycoplasma pneumoniae* (в день обращения) в мокроте – положительно.

Определение ДНК сопутствующих инфекционных возбудителей (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Chlamydia pneumoniae*) – отрицательно.

Рентгенография обзорная органов грудной клетки в день обращения – рентгенологическая картина острой верхнедолевой очаговой правосторонней пневмонии.



Таблица 3

Данные общего анализа крови пациента с микоплазменной пневмонией в день первичного обращения и после клинического выздоровления

Table 3

General blood test findings of a patient with *Mycoplasma pneumoniae* on the day of the treatment initiation and after clinical recovery

Показатель	В день обращения	После выздоровления
WBC, 10 ⁹ g/l	6,76	6,1
Neu, %	58,4	51,1
Lym, %	32,2	55,8
Mon, %	7,7	8,0
Eos, %	1,7	3,8
Bas, %	0,0	0,5
RBC, 10 ¹² g/l	4,65	4,9
PLT, 10 ⁹ g/l	321	304
СОЭ, мм/ч	10	9

На момент обращения ребенка клинических признаков атипичного течения пневмонии, кроме верхнедолевой локализации воспалительного очага, не выявлено. Ребенку стартово был назначен антибактериальный (АБ) препарат из группы цефалоспоринов из расчета 60–80 мг/кг/сут, инфузия солевых растворов. Практически на 2-е сутки лечения отмечена положительная динамика по отсутствию лихорадки. Единственным симптомом, сохраняющимся и почти не менявшимся на протяжении 4–5 суток АБ-монотерапии, был довольно сильный кашель. На 4-е сутки АБ-терапии цефалоспоринами, ввиду сохранения кашля, появления вновь однократно эпизода подъема температуры тела до субфебрильных цифр, а также получения положительных результатов исследования мазка из зева на определение ДНК *Mycoplasma pneumoniae*, был подобран дополнительно АБ-препарат из группы макролидов азитромицин из расчета 10 мг/кг/сут. На 3-и сутки комбинированной АБ-терапии наблюдали положительную динамику в виде увлажнения кашля, появления аппетита, улучшения общего самочувствия. На 8-е сутки лечения был произведен рентгенологический контроль, на 10-е сутки лечения (15-е сутки заболевания) ребенок полностью выздоровел.

2. Девочка К., 3,5 года, обратилась с жалобами на длительный кашель в течение последних 1,5 месяца. Со слов матери, лихорадки не было. Аппетит и самочувствие не страдали. Обращались к врачу, лечились симптоматически, в том числе проходили ингаляционную терапию с перерывами в 4–5 суток неоднократно. Не обследованы на момент обращения дополнительно лабораторно и рентгенологически. При осмотре не отмечается признаков значимых отклонений в самочувствии, нет интоксикации, симптомов декомпенсации. Аускультативно небольшая жесткость дыхания, хрипов нет, перкуторно над легкими коробочный звук. Кашель малопродуктивный, присутствует, в том числе и ночью.

Данные лабораторных методов исследования у пациента представлены в табл. 4. Определение уровня СРБ в день обращения – отрицательно.

Определение ДНК *Mycoplasma pneumoniae* в мазке из зева – положительно.

Дополнительно проведено обследование на определение ДНК пневмококка, хламидий и гемофильной инфекции типа В – не обнаружено.

Таблица 4
Данные общего анализа крови пациента с микоплазменным бронхитом в день первичного обращения и после клинического выздоровления
Table 4
General blood test findings of a patient with mycoplasma bronchitis on the day of the treatment initiation and after clinical recovery

Показатель	В день обращения	После выздоровления
WBC, 10 ⁹ g/l	13,82	6,8
Neu, %	59,8	51,1
Lym, %	28,3	55,8
Mon, %	10,7	8,0
Eos, %	1,2	3,8
Bas, %	0,0	0,5
RBC, 10 ¹² g/l	4,3	4,5
PLT, 10 ⁹ g/l	401	390
СОЭ, мм/ч	10	7

Обзорная рентгенография органов грудной клетки – усиление сосудистого рисунка в прикорневых зонах, очаговых и инфильтративных теней в легких не обнаружено.

В качестве первой линии АБ-терапии были назначены азитромицин перорально из расчета 10 мг/кг/сут в течение 7 суток, небулайзерная терапия комбинированным препаратом гиалуроновой кислоты и гипертоническим раствором натрия хлорида на весь период АБ-терапии. Положительная динамика терапии отмечена на 3-и сутки лечения в виде купирования ночных эпизодов кашля, а далее его увлажнения и улучшения отхождения мокроты. После осмотра в динамике на 8-е сутки лечения отмечено выздоровление пациента.

■ **ВЫВОДЫ**

1. Поражение нижних дыхательных путей, вызванное *Mycoplasma pneumoniae*, у 75% детей протекало по типу очаговой пневмонии. Средний возраст детей, на который приходились пневмонии, колебался в диапазоне 4–14 лет.
2. Поражение дыхательных путей *Mycoplasma pneumoniae*, независимо от уровня и тяжести течения, не сопровождалось значимыми изменениями показателей общего анализа крови: не было выявлено увеличения количества лейкоцитов, лейкоцитарная формула оставалась без значимых сдвигов, не была повышена СОЭ.
3. Исследование мокроты и соскобов из полости рта методом ПЦР позволило определить этиологию возбудителя (облигатно патогенного для человека).
4. Среднее время элиминации возбудителя на фоне проводимой комплексной терапии составляло 5–7 суток (по данным контрольных ПЦР-исследований в динамике течения заболевания). Среднее время выздоровления, по данным рентгенологической картины в легких, составляло 7–9 суток. Двое детей сохраняли рентгенологическую картину поражения в легких более 14 суток при отсутствии значимой клинической симптоматики.
5. Лечение микоплазменной инфекции в амбулаторных условиях заключалось в отказе от использования гормональной небулайзерной терапии, в комбинации

антибактериальных препаратов макролидного и цефалоспоринового ряда, в использовании комбинированного препарата гиалуроновой кислоты и гипертонического раствора натрия хлорида в качестве небулайзерной терапии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Informanion review on pneumoniae by the World Health Organization, November 2016. URL: http://www.who.int/topics/pneumococcal_infections/ru (in Russian)
2. Harlamova F.S., Shamsheva O.V., Vorobyeva D.A., et al. Mycoplasma Infection in Children: Current Diagnosis and Treatment. *Children Infections*. 2016;15(3):50–57. (In Russ.) <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2016-15-3-50-57>
3. Saraya T., Nakata K., Nakagaki K., et al. Identification of a mechanism for lung inflammation caused by Mycoplasma pneumoniae using a novel mouse model. *Results Immunol*. 2011;1:76–87.
4. Onishchenko G.G., Yezhlova E.B., Demina Yu.V. Respiratory tract infections. Epidemiological surveillance of community-acquired pneumoniae: methodological recommendations. Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor. Inv. № 3.1.2.3047-13; 3.1.2. Moscow, 2013. (In Russ.)
5. Nikiforov V.V., Shakhmardanov M.Z., Suranova T.G. (2025) *Respiratory mycoplasmosis in adults. A training manual for doctors*.
6. Jain S., Williams D.J., Arnold S.R. Community-acquired pneumoniae requiring hospitalization among US children. *N Engl J Med*. 2015;372(9): 835–845.
7. Waites K.B., Talkington D.F. Mycoplasma pneumoniae and Its Role as a Human Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004;17(4):697–728.doi: 10.1128/CMR.17.4.697-728.2004
8. State report "On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2024" (In Russ.).
9. Cardinale F., Chironna M., Chinellato I., et al. Clinical significance of Mycoplasma pneumoniae macrolide resistance in children. *J Clin Microbiol*. 2013;51:723–734.
10. Stratchounskiy L.S., Kozlov S.N. (1998) [Macrolides in modern clinical practice]. Smolensk: Rusich. (In Russ.)
11. Kannan T.R., Baseman J.B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:6724–6729.
12. Harlamova F.S., Shamsheva O.V., Vorobyeva D.A., et al. Mycoplasma infection in children: current diagnosis and treatment. *Children infections*. 2016;15(3):50–57. (In Russ.) <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2016-15-3-50-57>



Davydova E.¹✉, Tolokontseva A.¹, Luparev A.¹, Polyakova V.¹, Gordukova M.², Shipulin G.¹

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks,
Moscow, Russia

² Children's City Clinical Hospital No. 9 named after G.N. Speransky, Moscow, Russia

Rapid Detection of Intestinal Pathogens in Fecal Samples Based on Multiplex Isothermal Amplification

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: conceptualization and methodology, resources, writing – original draft preparation – Davydova E.; investigation – Tolokontseva A., Luparev A.; validation – Polyakova V., Gordukova M.; collection of clinical samples – Gordukova M.; writing – review and editing – Davydova E., Tolokontseva A.; visualization – Tolokontseva A.; supervision and funding acquisition – Shipulin G.

Ethics statement: this study was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration; the study's protocol was reviewed and approved by the local ethics committee of Children's City Clinical Hospital No. 9 named after G.N. Speransky (protocol No. 44 dated 04/19/22).

Informed consent: informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data availability statement: all raw data are available at <https://osf.io/y2gt8/files/osfstorage>.

The article is published in author's edition.

Submitted: 10.09.2025

Accepted: 29.12.2025

Contacts: EDavydova@cspfmmba.ru

Abstract

Introduction. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has been successfully implemented for the detection of a wide range of pathogens of infectious diseases. However, LAMP is typically used to detect a single pathogen in one tube, this fact limits the usefulness of the LAMP for in vitro diagnostics.

Purpose. To develop an assay based on multiplex LAMP with fluorescent-labeled assimilating probes for detecting the DNA of *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., Human adenoviruses F (HAdV F), and compares the LAMP diagnostic characteristics with those of a PCR kit used for in vitro diagnostics.

Materials and methods. Clinical samples (fecal, n=100) from children with symptoms of acute gastroenteritis were obtained from Children's City Clinical Hospital No. 9 (Moscow, Russia). AmpliTest® Ribo-Prep and AmpliTest® Magno-Sorb-Combo (Centre for Strategic Planning of FMBA, Russia) were used for extraction of DNA from fecal extracts. A real-time PCR AmpliSens® OKI-screen-FL kit was used for in vitro diagnostic of *Shigella* spp. / Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), *Salmonella* spp., thermophilic *Campylobacter*s, and HAdV F. LAMP target-specific primers were designed on unique template regions of intestinal pathogens using Primer Explorer V (Fujitsu, Japan) and the NCBI BLAST homologous sequence search resource. The LAMP mixture contained 16 U of Bst-polymerase (Genterra, Russia), 5X LAMP buffer (Genterra, Russia), 1.5 mM each dNTP (Biosan, Russia) and the primer mixture. For the mono-LAMP assays, we used the concentrations of oligonucleotides recommended by New England Biolabs, for multiplex LAMP assays, the concentrations of oligonucleotides were the same or reduced to 70–40% of the initial concentration. A CFX96 real-time PCR thermocycler (Bio-Rad, USA) was used for both PCR and LAMP assays.



Results. We provided reproducible LAMP co-amplification of DNA of several pathogens by reducing the concentration of LAMP primers from the recommended concentration. The detection limit of the assay is 5×10^3 DNA copies/ml of fecal extract for all targets. The high specificity of LAMP has been shown for heterologous microorganisms and viruses, as well as for clinical samples that do not contain DNA from the target pathogens. The results obtained by LAMP for clinical samples from patients with intestinal infections correlated with the real-time PCR results obtained by an in vitro diagnostics kit, except for four samples with an extremely low load of pathogen DNA ($C_t > 37$).

Conclusion. The use of LAMP in combination with automated protocols of DNA extraction allows the study time to be reduced to one hour. Practical implementation of the f-LAMP assay will increase laboratories' performance without increasing the amount of equipment and significantly speeding up the diagnosis.

Keywords: rapid diagnostic tests, loop-mediated isothermal amplification, intestinal infection, analytical sensitivity and specificity, diagnostic performance

Давыдова Е.Е.¹✉, Толоконцева А.А.¹, Лупарев А.Р.¹, Полякова В.А.¹, Гордукова М.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия

² Детская городская клиническая больница № 9 имени Г.Н. Сперанского, Москва, Россия

Метод быстрого обнаружения кишечных патогенов в образцах фекалий на основе мультиплексной изотермической амплификации

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция исследования и методология, написание текста, работа с источниками литературы – Давыдова Е.Е.; проведение исследований – Толоконцева А.А., Лупарев А.Р.; валидация результатов – Полякова В.А., Гордукова М.А.; коллекция биоматериала – Гордукова М.А.; редактирование – Давыдова Е.Е., Толоконцева А.А.; подготовка иллюстраций – Толоконцева А.А.; руководство и получение финансирования – Шипулин Г.А.

Этическое заявление: настоящее исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации; протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Детской городской клинической больницы № 9 имени Г.Н. Сперанского (протокол № 44 от 19.04.2022).

Информированное согласие: от всех участников исследования было получено информированное согласие.

Заявление о доступности данных: исходные данные доступны по адресу: <https://osf.io/y2gt8/files/osfstorage>.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 10.09.2025

Принята: 29.12.2025

Контакты: EDavydova@cspfmba.ru

Резюме

Введение. Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) успешно применяется для выявления широкого спектра возбудителей инфекционных заболеваний. Однако в большинстве случаев его возможности для in vitro диагностики ограничены выявлением только одного ДНК патогена в одной реакции.

Цель. Разработать тест на основе мультиплексной LAMP с флуоресцентно меченными ассимилирующими праймер-зондами для выявления ДНК *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. и аденовирусов человека F (HAdV F), а также сравнить диагностические характеристики LAMP с характеристиками медицинского изделия для диагностики *in vitro* на основе ПЦР.

Материалы и методы. Клинические образцы (фекалии, $n=100$) от детей с симптомами острой кишечной инфекции были получены из Детской городской клинической больницы № 9 города Москвы, Россия. Выделение ДНК из фекальных экстрактов проводили с использованием наборов «АмплиТест® Рибо-Преп» и «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» (ФГБУ ЦСП ФМБА России). Для детекции наличия ДНК *Shigella* spp. / энтероинвазивных *Escherichia coli* (EIEC), *Salmonella* spp., термофильных *Campylobacters* и HAdV F использовали ПЦР-набор для *in vitro* диагностики AmpliSens® OKI-screen-FL. Специфические LAMP праймеры были выбраны на уникальных участках геномов кишечных патогенов с использованием программы Primer Explorer V (Fujitsu, Япония) и ресурса поиска гомологичных последовательностей NCBI BLAST. Реакционная LAMP смесь содержала 16 ед. Bst-полимеразы (Genterra, Россия), 5X LAMP-буфер (Genterra, Россия), 1,5 мМ каждого dNTP (Biosan, Россия) и специфические LAMP праймеры. Для амплификации одной мишени в реакции использовали концентрации олигонуклеотидных праймеров, рекомендованные New England Biolabs. Для LAMP в мультиплексном формате концентрации олигонуклеотидов оставляли теми же либо снижали до 70–40% от исходной. Для проведения ПЦР и LAMP-реакций использовали термоциклер CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, США).

Результаты. Обеспечена воспроизводимая LAMP ко-амплификация ДНК нескольких патогенов в одной пробирке путем снижения концентрации LAMP-праймеров относительно рекомендуемой. Предел обнаружения кишечных патогенов разработанным методом составляет 5×10^3 копий/мл в осветленном экстракте фекалий для всех целевых мишеней. Высокая специфичность метода показана на ДНК гетерологичных микроорганизмов и вирусов, а также на клинических образцах, не содержащих ДНК целевых патогенов. Результаты, полученные с помощью LAMP-метода для клинических образцов пациентов с кишечными инфекциями ($n=100$), коррелировали с результатами ПЦР, полученными с использованием набора реагентов для диагностики *in vitro*, за исключением четырех образцов с крайне низкой концентрацией ДНК возбудителя инфекции.

Заключение. Использование LAMP в сочетании с автоматизированными протоколами выделения ДНК позволяет сократить время исследования до одного часа, что дает возможность не только быстрее поставить диагноз заболевания пациенту с кишечной инфекцией, но и повысить производительность лаборатории без увеличения парка оборудования.

Ключевые слова: экспресс-тесты, петлевая изотермическая амплификация, кишечная инфекция, аналитическая чувствительность и специфичность, диагностическая эффективность



■ INTRODUCTION

Gastroenteritis caused by bacterial or viral pathogens does not significantly differ in symptoms but requires different treatments. Therefore, laboratory tests are crucial to confirm the diagnosis. The progress of molecular methods has simplified the identification of pathogens, providing high sensitivity and specificity of detection [1, 2]. Prompt treatment is essential for curing acute gastroenteritis, so the importance of rapid diagnostic tests that are as sensitive as PCR is very high. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an example of rapid amplification that reduces the reaction time by up to 15–30 minutes. LAMP assays have been successfully implemented for the detection of a wide range of infectious disease pathogens [3–5]. Separate LAMP reactions can be multiplexed in a single tube, for example, when hybridization of fluorescent probes with various fluorescent dyes is used. Multiplex reactions make it possible to detect various infectious pathogens simultaneously [6] or to identify target DNAs in the presence of an internal control sample [7], thus, the demand for multiplexed diagnostics has become more pressing.

The genome variability of some gastrointestinal pathogens, such as noroviruses and rotaviruses, limits the application of LAMP due to the large number of primers covering the target fragment and the difficulty in avoiding the mismatch of primers with various epidemic isolates. However, LAMP has become a good diagnostic tool for pathogens with highly conserved genomes, such as *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* or Human adenoviruses F. LAMP-based assays are particularly well suited for testing at the point of care and are especially important for bacterial intestinal infections, which often require rapid antimicrobial chemotherapy.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To develop an assay based on multiplex LAMP with fluorescent-labeled assimilating probes for detecting the DNA of *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., Human adenoviruses F (HAdV F), and compares the LAMP diagnostic characteristics with those of a PCR kit used for in vitro diagnostics.

■ MATERIALS AND METHODS

Strains

Strains of human mastadenovirus type B (hAdV 7, hAdV 21), type C (hAdV 1, hAdV 2, hAdV 3, hAdV 4, hAdV 5, hAdV 6), and type D (hAdV 8), with viral titers of at least 3,0 log TCID₅₀/ml, were provided by Smorodintsev Influenza Research Institute (St. Petersburg, Russia). Strain of human mastadenovirus type F (hAdV 41) with titers 10⁶ copies DNA/ml was provided by the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia (Moscow, Russia). The strains *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428, *E. coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Candida albicans* ATCC 10231 were obtained from the American Type Culture Collection. *S. enteritidis* 5765, *S. infantis* 158/51, *S. typhimurium* 9640, *Shigella sonnei* 233169, *E. coli* M17, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 were provided by the collection of the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia (Moscow, Russia). The concentrations of the strains were not less than 1×10⁷ copies/ml.

Clinical Samples

Clinical residual samples (fecal, n=100) from children with symptoms of acute gastroenteritis were obtained from Children's City Clinical Hospital No. 9, named after G.N. Speransky of the Moscow Health Care Department (Moscow, Russia). The samples were stored frozen at -20 to -16 °C until processing for no more than a week. To prepare the fecal extract, approximately 0.1 g (0.1 ml) of feces was resuspended in 0.8 ml of phosphate-buffered saline (VWR International, LLC, USA). The homogeneous suspension was centrifuged at $10,000 \times g$ on a MiniSpin (Eppendorf, Germany) for 5 minutes, and the supernatant near the surface of the sediment was collected and stored at -70 °C for further use.

Extraction of DNA

AmpliTest® Ribo-Prep and AmpliTest® Magno-Sorb-Combo (Centre for Strategic Planning of FMBA, Russia) in vitro diagnostic kits were used for extraction of DNA from fecal extracts.

AmpliTest® Ribo-Prep was used before the PCR tests, as recommended by the AmpliSens® OKI-screen-FL kit manual. The AmpliTest® Ribo-Prep assay is based on guanidinium thiocyanate lysis followed by isopropanol precipitation of nucleic acids and dissolution of the pellet in elution buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)). An exogenous internal control from the AmpliSens® OKI-screen-FL kit was added per 100 µl of each fecal extract sample before DNA extraction. The DNA was eluted in 200 µl of elution buffer.

AmpliTest® Magno-Sorb-Combo, which is based on the magnetic bead technique and is recommended for DNA extraction in automatic mode, was used before the LAMP tests. An AutoPure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., China) system was used for DNA extraction in automatic mode. An exogenous internal control ICL (10 µl of λ -bacteriophage with 5×10^5 particles/ml) was added per 100 µl of each fecal extract sample before DNA extraction. The DNA was eluted in 200 µl of elution buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)).

PCR

All the clinical samples were tested for *Shigella* spp. / Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), *Salmonella* spp., thermophilic *Campylobacters*, and HAdV F via a real-time PCR AmpliSens® OKI-screen-FL in vitro diagnostic kit after DNA extraction with an AmpliTest® Ribo-Prep kit. Real-time PCR was performed in a CFX96 RealTime PCR thermocycler (Bio-Rad, USA).

Design of LAMP Primers

The primers at the 5' region of the hexon gene of HAdV F were described previously [8]. Multiple alignments of *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacters* spp. nucleotide sequences were performed using the Clustal W algorithm in MEGA X [9]. The invasive genes *ipaH* [10, 11] and *invA* [12] were used for the detection of *Shigella* spp. / EIEC and *Salmonella* spp., respectively, and the gene encoding the ATP-binding protein CJE0832 [13] was used for the detection of thermophilic *Campylobacters* (*C. jejuni* and *C. coli*) (Table 1).



Table 1
LAMP targets for the detection of causative agents of acute intestinal infections.

LAMP target DNA	Gene	Size of target DNA	Location in reference genome
Shigella spp. / EIEC	ipaH	313 bp	528407 – 528719 (CP037923.1)
Salmonella spp.	invA	288 bp	994937 – 995224 (CP099973.1)
therm. Campylobacters	CJE0832	303 bp	1232568 – 1232870 (CP044162.1)
HAdV F	hexon	274 bp	17520 – 17793 (MK962810.1)
λ-bacteriophage		317 bp	38279 – 38595 (NC001416.1)

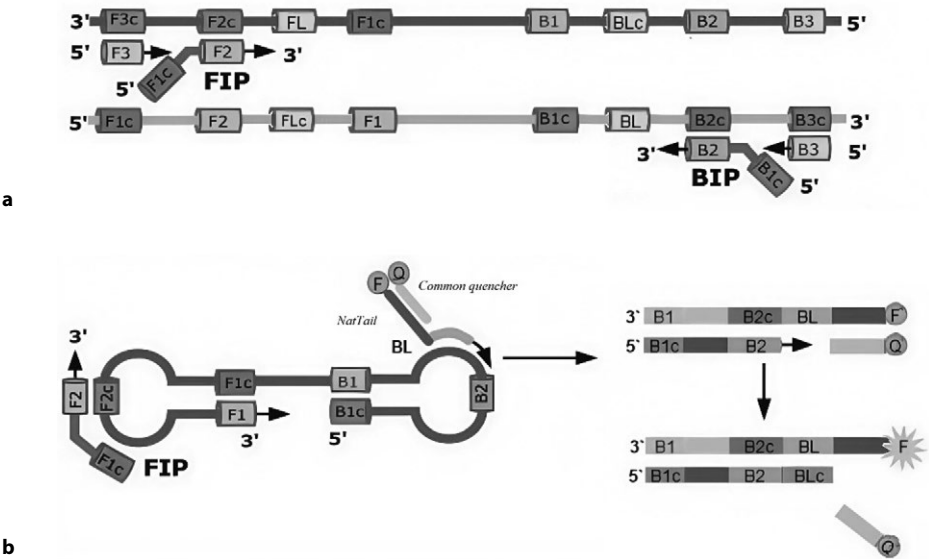


Fig. 1. Fluorescence-based LAMP using a displacement probe: a – the locations of F3, B3, FL, BL, FIP (F1c and F2 fragments), BIP (B1c and B2 fragments) primers and their complementary regions on the target DNA are shown; b – the fluorescent NatTail – LF primer (FAM, R6G or ROX labeled) with complementary Common quencher (BHQ1 or BHQ2 labeled) is extended by a strand-displacing polymerase; extension of DNA from the reverse primer then reads through the FL region, displacing the Common quencher. This separates the fluorophore from the quencher, allowing the fluorescence to be observed in real-time [15]

LAMP target-specific forward and backward outer (F3, B3), inner (FIP, BIP) and loop (FL, BL) primers were designed on unique template regions of intestinal pathogens using Primer Explorer V (Fujitsu, Japan) and the NCBI BLAST homologous sequence search resource [14]. The fluorescently labeled assimilating probes NatTail conjugated with loop primers BL with complementary quenching-labeled Common quencher oligonucleotide described previously by Yaren O. et al. [15], were designed for each target. The relative placement of the LAMP primers is shown in the Figure 1. All oligonucleotides were synthesized and HPLC purified (JSC Gentera, Russia).

Positive LAMP Control

The target DNA was isolated from the *C. jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 29428, *S. enteritidis* 5765, *Shigella sonnei* 233169, and HAdV F 41 strains. PCR amplification of the target

DNA fragments was performed in 25- μ l reaction volumes containing 0.4 μ M of F3 and B3 appropriate primers, 0.25 mM each dNTP (Biosan, Russia), 5 U TaqF polymerase, 70 mM Tris-HCl pH 8.3 (Sigma-Aldrich, USA), 4 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, USA), 80 mM KCl (Sigma-Aldrich, USA), 0.2 mM BSA (Genterra, Russia), and 10 μ l of template DNA. PCR was carried out on a Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Germany), and the cycling conditions were 95 °C for 15 min, 40 cycles of 95 °C for 15 sec, 60 °C for 30 sec, and 72 °C for 15 sec.

The PCR products were inserted into the linear vector pAL2-TA (Evrogen, Russia) with T sticky ends to yield the recombinant plasmids pSalm, pShig, pCamp, and pAdvF. The nucleotide sequences of the recombinant plasmids were confirmed by Sanger sequencing.

The concentrations of each type of plasmid DNA were evaluated using digital PCR on a QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, USA) with a mixture of Eva Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA) and F3/B3 primer mix with 0.25 mM of each primer. The thermal cycling program was 95 °C for 5 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 60 s, 4 °C for 5 min, and 90 °C for 5 min.

The DNA of pSalm, pShig, pCamp, and pAdvF was mixed and diluted to 2×10^4 copies/ml of each plasmid for use as a positive LAMP control.

Real-Time F-LAMP

The LAMP mixture contained 16 U of Bst-polymerase (Genterra, Russia), 5 μ l of 5X LAMP buffer [5X LAMP buffer: 340 mM Tris-HCl, 80 mM (NH₄)₂SO₄, 40 mM MgCl₂, 0.5% Tween-20, 0.5 mg/ml BSA, pH 8.5] (Genterra, Russia), 1.5 mM each dNTP (Biosan, Russia), 10 μ l of the primer mixture, and 10 μ l of DNA sample. The reaction volume was 25 μ l.

For the mono-LAMP assays, we used the recommended concentrations of oligonucleotides [16]: FIP 1.6 μ M; BIP 1.6 μ M; F3 0.2 μ M; B3 0.2 μ M; FL 0.16 μ M; BL 0.04 μ M; NatTail-BL 0.24 μ M, Common quencher 0.32 μ M. For multiplex LAMP assays, the concentrations of oligonucleotides were the same or reduced to 70–40% of the initial concentration.

In each experiment, positive (2×10^4 copies/ml each pSalm, pShig, pCamp, and pAdvF plasmid DNA) and negative (TE buffer) LAMP controls were used.

A CFX96 real-time PCR thermocycler (Bio-Rad, USA) was used, the reaction time at 65 °C was ~40 min, and fluorescence was acquired every 30 sec.

Evaluating the Sensitivity and Specificity of Real-Time LAMP

The sensitivity of the assay was evaluated using serial mix dilutions containing plasmid DNA at concentrations close to the cutoff value for LAMP performance. The pSalm, pShig, pCamp, and pAdvF plasmids were added to the nucleic acids extracted from the fecal samples to final concentrations of 10^3 , 5×10^3 , or 10^4 copies/ml of each plasmid. The absence of *Shigella* spp. / EIEC, *Salmonella* spp., thermophilic *Campylobacters* and HAdV F DNA in the fecal samples was previously verified via the AmpliSens® OKI-Screen-FL PCR Kit. Each sample was tested in twelve repeats. The detection limit was considered the lowest concentration of DNA detected in all repeats.

The specificity of the f-LAMP assay (no cross-reactivity with other pathogens) was evaluated via the extraction of viral and bacterial DNA from the abovementioned strains via AmpliTest® Magno-Sorb-Combo.



Statistical Data Analysis

Diagnostic sensitivity and specificity were calculated by MEDCALC (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) using information about true (TP)- and false (FP)-positive and true (TN)- and false (FN)-negative results from f-LAMP assays.

RESULTS

Design and Optimization of F-LAMP with Simultaneous Detection of Multiple Targets

We designed primers and fluorescently labeled loop primer probes such that the LAMP-based assay could involve simultaneous multiplex processes with separate detection of each target through different channels, as shown in Table 2. HAdV F and Salmonella spp. DNA were coamplified in one tube, and Shigella spp., thermophilic Campylobacters and ICL (λ-bacteriophage) DNA were coamplified in another tube.

The efficiencies of independent mono-LAMP reactions and multiplexed LAMP reactions with different ratios of primers were compared. The LAMP multiplex mixtures contained oligonucleotides at concentrations similar to those used in mono-assays (AS 1, SC 1) or at reduced concentrations (AS 2, AS 3, AS 4, SC2, SC3, SC 4) (Figure 2). The time to results estimated as the threshold cycle, Ct, in which the growth of fluorescence can be detected, increased during multiplex LAMP, especially when oligonucleotide concentrations optimal for LAMP mono-assays were used [16]. Compared with mono-assay, duplex AS1 reaction time was increased to ~7 min (ΔC_t HAdV = 14,3) for HAdV F and to ~1 min (ΔC_t Salm = 2,6) for Salmonella. Similarly, triplex SC1 reaction time was increased to ~6 minutes (ΔC_t Shig = 11,8) for Shigella and to ~10 minutes (ΔC_t Camp = 18,9) for Campylobacter (Figure 2). In the case of Campylobacter’s curves, a delay in the reaction rate was accompanied by a decrease in the level of the fluorescent signal and a violation of the shape of the curves.

When the oligonucleotides concentrations in the multiplex mixture were reduced, the reaction rate for all target DNA were increased. The optimal reaction mixture for HAdV F and Salmonella DNA co-amplification were empirically determined as AS 4 with reductions in the concentrations of oligonucleotides HAdV F and Salmonella of 30% and 50%, respectively show 4 minutes for HAdV F and to 2 minutes for Salmonella. For the SC mixtures, the best result was achieved by reducing the concentrations of primers for Shigella by 60%, Campylobacter by 50% and ICL by 60% (SC 4 mix), and the threshold time shift was no more than 5 min for both Shigella and Campylobacter targets.

Although the multiplex AS 4 and SC 4 mixtures resulted in a 2–3-fold decrease in the intensity of fluorescence accumulation than that of the mono-reactions, as shown in Figure 3, the fluorescence curves had a good exponential form, and the reaction rates slowed for no more than 2–5 min (ΔC_t 4–10).

Table 2
Design of the LAMP multiplex mixtures

LAMP	FAM	HEX (R6G)	ROX
SC mix	ICL (λ-bacteriophage)	Shigella spp., EIEC (ipaH gene)	thermophilic Campylobacters (CJE0832 gene)
SA mix	not taken into account	HAdV F (hexone gene)	Salmonella spp. (invA gene)

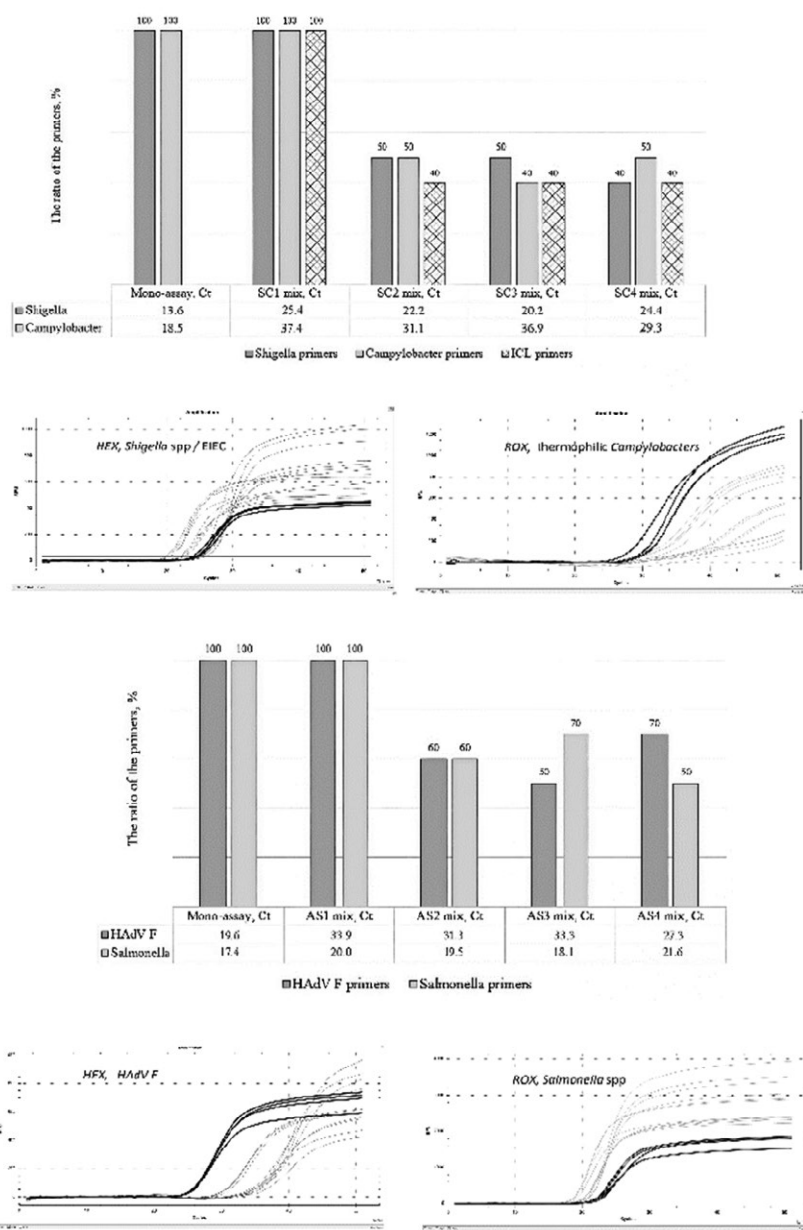


Fig. 2. Comparison of mono-assays and multiplex f-LAMP assays with different concentrations of oligonucleotide primers for HAdV F, Salmonella, Shigella and Campylobacter's DNA amplification. For multiplex LAMP assays, the concentrations of oligonucleotides were the same as for mono-assays (100%) or reduced to 70–40% of the initial concentration. The DNA extracted from fecal in the presence of ICL (λ -bacteriophage 5×10^4 particles/ml) and contaminated with pSalm, pShig, pCamp, or pAdvF to a final concentration of 10^5 copies/ml of each plasmid were used. The duplex AS2 mixture for DNA of HAdV F and Salmonella co-amplification and triplex SC1 for DNA Shigella, Campylobacter and ICL co-amplification are highlighted by bold curves on each LAMP graph

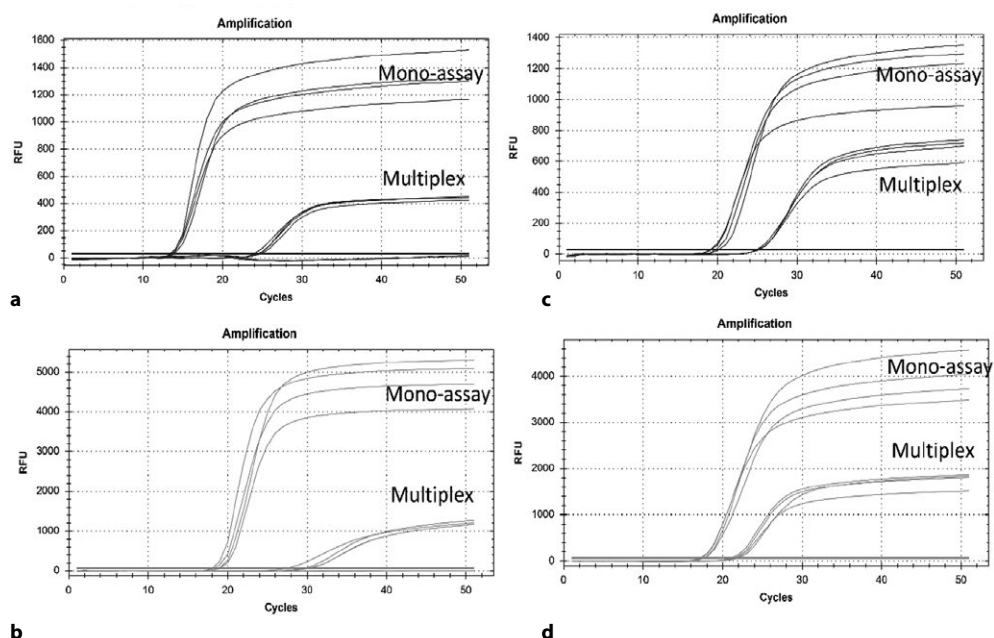


Fig. 3. LAMP mono- and multiplex optimized mixtures. The concentration of each target DNA (Shigella, Campylobacter, Salmonella, and HAdV F) was approximately 10^5 copies/ml: a – HEX, Shigella primers mixture versus triplex SC4 mixture; b – ROX, Campylobacter primers versus triplex SC4 mixture; c – HEX, HAdVF primers versus duplex AS4 mixture; d – ROX, Salmonella primers versus duplex AS4 mixture

Analytical Sensitivity and Specificity of the F-LAMP Assay for Pathogen DNA Detection in Fecal Extracts

The analytical sensitivity of f-LAMP was evaluated using serial dilutions of target DNA in a solution of nucleic acids isolated from a fecal extract that does not contain gastrointestinal pathogens, according to the PCR results. The DNA of Shigella, Salmonella, Campylobacter and HAdV F was reproducibly detected at concentrations up to 5×10^3 copies/ml. The average cycle threshold values (1 cycle = 30 sec) varied from 24 to 35 depending on the target and the concentration of DNA (Figure 4).

The specificity of f-LAMP for the detection of Salmonella, Shigella, EIEC, thermophilic Campylobacters, and HAdV F was confirmed using various human adenoviruses and bacterial strains listed in the Materials and Methods. The LAMP time was increased to 60 min (up to 120 cycles), and no cross-reactions were detected.

Diagnostic Performance Characteristics of the F-LAMP Assay

The clinical sensitivity and specificity of the f-LAMP assay were estimated via a clinical panel of 100 fecal extract samples consisting of PCR-positive HAdVF (n=27), Campylobacter (n=19), Salmonella (n=15), Shigella/EIEC (n=18), HAdV F and Salmonella (n=2), HAdV F and Shigella/EIEC (n=2), HAdV F and Campylobacter (n=1), and PCR-negative samples for all the targets (n=16).

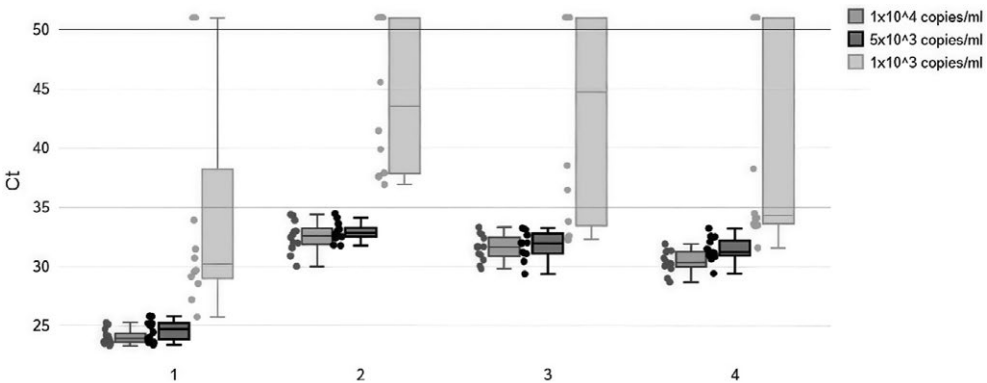


Fig. 4. Analytical sensitivity of the f-LAMP assay. Serial dilutions (1×10^4 copies/ml, 5×10^3 copies/ml or 1×10^3 copies/ml) of target DNA of Salmonella, Shigella, EIEC, thermophilic Campylobacters, and HAdV F in a solution of nucleic acids isolated from a fecal extract were tested in twelve repeats. The threshold f-LAMP cycles, Ct, for Shigella/EIEC (1); Campylobacter (2); HAdV F (3); Salmonella (4) are indicated by dots. The samples with no LAMP amplification (no Ct LAMP) are located higher than Ct LAMP = 50

Table 3
Evaluation of LAMP for the detection of gastrointestinal pathogens in clinical specimens

	PCR		LAMP			Diagnostic performance			
	Total n=100 samples					specificity		sensitivity	
	positive	negative	positive	false-negative	negative	value, %	interval, % p=0.95	value, %	interval, % p=0.95
HAdV F	32	68	29	3	68	100	94.7–100.0	90.6	75.0–98.0
Salmonella spp.	17	83	17	0	83	100	95.7–100.0	100	80.5–100.0
Shigella spp.	20	80	20	0	80	100	95.5–100.0	100	83.2–100.0
Thermophilic Campylobacters	20	80	19	1	80	100	95.5–100.0	95.0	75.1–99.9

The results of the f-LAMP performance for the detection of gastrointestinal pathogens in clinical samples in comparison with those of PCR are presented in Table 3. The f-LAMP assay combined with automatic DNA extraction allows the detection of HAdV F, Shigella/EIEC, Salmonella and thermophilic Campylobacters in almost all PCR-positive samples. The exceptions were four samples with extremely low loads of target DNA: three HAdV F-positive samples (Ct PCR ~37–40) and Campylobacter-positive sample (Ct PCR ~39). The performance characteristics of the LAMP assay are presented in Table 3.

Thus, the diagnostic sensitivity of f-LAMP was up to 90.6%, which was slightly less than the PCR sensitivity for samples with extremely low target DNA loads. The high diagnostic specificity of LAMP was shown, and all PCR-negative clinical samples were determined to be negative by LAMP.



■ DISCUSSION

LAMP has gained enormous popularity as a rapid detection method for numerous infectious pathogens in resource-limited health care settings or onsite. Its utility and efficacy have been well demonstrated by various researchers in the diagnosis of bacterial, viral or parasitic diseases [17–21]. However, LAMP is typically used to detect a single pathogen, not for simultaneous co-amplification of multiple targets in one reaction such as PCR. This fact limits the usefulness of the LAMP assay for in vitro diagnostics.

The advantage of the multiplex format is the ability to identify several targets at once in one tube, as well as the possibility of coamplifying target DNA with the internal control DNA to assess the efficiency of nucleic acid extraction. There are several approaches to achieve multiplex LAMP-based detection. LAMP with assimilating loop primer-probes [15], as well as standard PCR with hybridization probes, makes simultaneous multiple target detection possible. However, while PCR requires only a pair of forward and reverse primers and one hybridization probe, the concentrations of which vary from 0.1 to 0.5 mM on average, LAMP requires many oligonucleotides of different lengths with high concentrations (0.2–1.6 mM) [22, 23]. Therefore, LAMP with multiple target detection requires a more thorough optimization of oligonucleotide concentrations to reduce their mutual influence.

The authors of [24] reported the development of duplex f-LAMP assays for the simultaneous amplification of DNA from some pathogens via fluorescence assimilating probes. They carried out amplification of *Salmonella* DNA coupled with DNA of λ -bacteriophage amplification, as well as co-amplification of DNA from *Ralstonia solanacearum* strains. During the duplex reactions, the limits of *R. solanacearum* and *Salmonella* DNA detection were 10- and 100-fold lower, respectively, than those in the mono-assays. The detection limit for *Salmonella* DNA in the duplexed reaction was 9.8×10^3 genomic equivalents per reaction, which is not enough for in vitro diagnostic tests.

The quadruplex f-LAMP for the detection of RNA from SARS-CoV-2 and influenza A/B viruses in combination with ACTB control RNA proposed by the authors [25] significantly decreased the speed of the reaction compared with the amplification of individual targets. After optimization of the LAMP multiplex reaction conditions, the analytical sensitivity was 100-fold worse for the FluB and SARS-CoV-2 targets and 10-fold worse for the FluA target than that of the PCR assay kit [25].

The authors of previous work [26] described a multiplex real-time LAMP technique with the melting curve analysis for *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* detection. To prevent the suppression of the amplification of *V. parahaemolyticus* targets, researchers have halved the concentration of *Salmonella* primers to achieve acceptable amplification efficiency for both types of pathogen DNA simultaneously. The detection limit for simultaneous detection of *S. typhimurium* and *V. parahaemolyticus* was found to be similar to that of LAMP mono-assays or multiplex PCR.

We have provided reproducible f-LAMP co-amplification of the DNA of pathogens causing acute intestinal infections by reducing the concentration of LAMP primers from the initial concentration recommended for mono-reactions. Quite an effective duplex or even triplex co-amplification of DNA targets was achieved empirically by reducing the concentration of primers by 30–60% from the initial concentrations. Identification of the target DNA under the simulations of mixed infections of *Campylobacter*, *Shigella*/EIEC, HAdV F and *Salmonella* was possible despite the slight speed reduction and

a decrease in the level of fluorescence signals compared with mono-reactions. As a result of the developed multiplex f-LAMP assay, all the targets are reproducibly detected up to a concentration of 5×10^3 copies/ml (50 genomic equivalents per reaction), which is comparable to the declared analytical sensitivity of the AmpliSens® OKI screen-FL PCR in vitro diagnostic kit (Shigella/EIEC, Salmonella, Campylobacter 1×10^3 copies/ml, HAdV F 1×10^4 copies/ml).

Different methods of nucleic acid extraction were used during the performance assessment of the f-LAMP assay and the AmpliSens® OKI screen-FL kit. The DNA extraction technique, which is based on sample lysis in a solution of guanidine isothiocyanate followed by alcohol precipitation of nucleic acids, is used in PCR diagnostics together with the AmpliSens® OKI screen-FL kit. This extraction protocol allows quick purification of the nucleic material; however, this is quite time-consuming with a large flow of investigated samples. For the detection of pathogens using f-LAMP, a modern automated DNA extraction protocol based on DNA separation on magnetized silica (AmpliTest® Magno-Sorb-Kombo) was chosen. Separation technology on magnetic spheres can significantly reduce the analysis time, especially in the case of a large flow of samples and can be applied to automate the extraction of DNA/RNA from various clinical materials, including swabs [27], sputum [28], blood plasma [29], and feces [30].

The results of studies of fecal extracts using the protocol for automatic DNA extraction and rapid f-LAMP amplification are almost completely comparable with the results of in vitro diagnostic PCR tests. The exceptions were only four samples with extremely low concentrations of target DNA.

Thus, even though multiplex LAMP reactions are quite complex and require minimizing the mutual influence of oligonucleotides by optimizing their concentrations and composition, we achieved satisfactory results with simultaneous DNA amplification of Salmonella and HAdV F, as well as with simultaneous DNA amplification of Shigella/EIEC, Campylobacter and the internal control.

The possibility of simultaneously detecting several pathogens in one multiplexed reaction is especially important in the case of the diagnosis of acute gastroenteritis, which is often caused by various combinations of mixed infections.

Based on multiplex LAMP protocol described in this article, a reagent kit, AmpliTest®_OKI_LAMP, for gastrointestinal pathogen detection in feces was designed. The kit has successfully passed clinical trials at an authorized organization [31]. Owing to its acceptable analytical and diagnostic performance, the f-LAMP assay was approved as a medical device for in vitro diagnostics in accordance with the regulations of the Eurasian Economic Union (certificate 2024/23503 2024.09.04).

■ CONCLUSION

Multiplex LAMP is a promising direction for the development of in vitro diagnostic methods for human infectious diseases. Using the fluorescent-labeled assimilating probes, we developed a rapid, sensitive, and specific LAMP assay for the simultaneous detection of multiple gastrointestinal pathogens.



■ REFERENCES

1. Logan C., O'Leary J.J., O'Sullivan N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9):3189–3195. <https://doi.org/10.1128/JCM.00915-06>
2. Gallichan S., Perez-Sepulveda B.M., Feasey N.A., et al. Multiplex PCR Assay for Clade Typing of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Microbiology spectrum*, 2022;10(6):e0318222. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03182-22>
3. Lee M.Y., Phan V.M., Lee W.J., et al. Developing a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Rapid Detection of Seven Respiratory Viruses including SARS-CoV-2. *Medicina (Kaunas)*. 2022;58(9):1224. <https://doi.org/10.3390/medicina58091224>
4. Nagai K., Horita N., Yamamoto M., et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:39090. <https://doi.org/10.1038/srep39090>
5. Quyen T.L., Vinayaka A.C., Golabi M., et al. Multiplexed Detection of Pathogens Using Solid-Phase Loop-Mediated Isothermal Amplification on a Supercritical Angle Fluorescence Array for Point-of-Care Applications. *ACS Sens.* 2022;7(11):3343–3351. <https://doi.org/10.1021/acssensors.2c01337>
6. Fan Q., Xie Z., Wei Y., et al. Development of a visual multiplex fluorescent LAMP assay for the detection of foot-and-mouth disease, vesicular stomatitis and bluetongue viruses. *PLoS One.* 2022;17(12):e0278451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278451>
7. Kline E.C., Panpradist N., Hull I.T., et al. Multiplex Target-Redundant RT-LAMP for Robust Detection of SARS-CoV-2 Using Fluorescent Universal Displacement Probes. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0158321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01583-21>
8. Shuryayeva A.K., Malova T.V., Tolokonceva A.A., et al. Development and application of LAMP assays for the detection of enteric adenoviruses in feces. *Microbiol Spectr.* 2022;10(4):e0051622. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00516-22>
9. Song T., Toma C., Nakasone N., Iwanaga M. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243(1):259–263. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.014>
10. Vu D.T., Sethabutr O., Von Seidlein L., et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):2031–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2031-2035.2004>
11. Yang Q., Domesle K.J., Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(6):309–331. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2445>
12. Bonjoch X., Calvo L., Soler M. et al. A New Multiplexed Real-Time PCR Assay to Detect *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Food Anal. Methods.* 2010;3:40–46. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9110-3>
13. Kumar S., Stecher G., Li M., et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
14. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (accessed on 10/09/2024). Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
15. Yaren O., Alto B.W., Gangodkar P.V., et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):293. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2382-0>
16. neb.com [Internet]. INSTRUCTION MANUAL WarmStart® LAMP Kit (DNA & RNA) (Version 6.0_3/23) [cited 14 Nov 2024]. Available from: <https://www.neb.com/en/-/media/nebus/files/manuals>
17. Carascal M.B., Destura R.V., Rivera W.L. Colorimetric Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Accurately Detect blaOXA-23-like and ISAbal Genes from *Acinetobacter baumannii* in Pure Cultures and Spiked Human Sera. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2024;30(10):432–441. <https://doi.org/10.1089/mdr.2024.0075>
18. Alfahl Z., Biggins S., Higgins O., et al. A rapid on-site loop-mediated isothermal amplification technology as an early warning system for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in water. *Microbiology (Reading, England)*. 2024;170(8):001485. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001485>
19. Moosavian M., Keshavarzi R., Abbasi Montazeri E., Hajiani E. Loop mediated isothermal amplification of *Clostridioides difficile* isolates in gastrointestinal patients. *AMB Express*, 2022;12(1):42. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01382-1>
20. Choi G., Moehling T.J., Meagher R.J. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert review of molecular diagnostics.* 2023;23(1):9–28. <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2169071>
21. Khurana S., Sharma C., Guleria S., et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal specimens. *Indian journal of medical microbiology.* 2024;47:100492. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2023.100492>
22. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
23. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16(3):223–9. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
24. Kubota R., Jenkins D.M. Real-time duplex applications of loop-mediated amplification (LAMP) by assimilating probes. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):4786–99. <https://doi.org/10.3390/ijms16034786>
25. Jee H., Park S., Lee J., et al. Comparative Clinical Evaluation of a Novel FluA/FluB/SARS-CoV-2 Multiplex LAMP and Commercial FluA/FluB/SARS-CoV-2/RSV RT-qPCR Assays. *Diagnostics (Basel)*. 2023;13(8):1432. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081432>
26. Liu N., Zou D., Dong D., et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Scientific reports.* 2017;7:45601. <https://doi.org/10.1038/srep45601>
27. Klein S., Müller T.G., Khalid D., et al. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses.* 2020;12(8):863. <https://doi.org/10.3390/v12080863>
28. He H., Li R., Chen Y. et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Sci Rep* 2017;7:45199 <https://doi.org/10.1038/srep45199>
29. Hourfar M.K., Michelsen U., Schmidt M., et al. High-throughput purification of viral RNA based on novel aqueous chemistry for nucleic acid isolation. *Clin Chem.* 2005;51(7):1217–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.048603>
30. Paulos S., Mateo M., de Lucio A. et al. Evaluation of five commercial methods for the extraction and purification of DNA from human fecal samples for downstream molecular detection of the enteric protozoan parasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba* spp. *J Microbiol Methods.* 2016;127:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.020>
31. Davydova E.E., Tolokonceva A.A., Luparev A.R., et al. Testing of a proposed reagent kit for detecting enteric pathogens by isothermal DNA amplification. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2024;69(9):210–220. doi: 10.17816/clcd641905, eLIBRARY ID: 80569342. Available from: <https://kld-journal.fedlab.ru/0869-2084/article/view/641905>



Ali R.H.¹, Jarullah A.B.², Abdulhusein S.H.²✉

¹ College of Education, Shatrah University, Al-Shatrah, Iraq

² College of Veterinary Medicine, Shatrah University, Al-Shatrah, Iraq

Identification of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* from Burns and Wounds Patients

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Ali R.H. – conceptualization, data curation, investigation, project administration, resources, software, writing – original draft and editing; Jarullah A.B. – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, and writing – editing; Abdulhusein S.H. – conceptualization, data curation, investigation, project administration, resources, writing – original draft and editing.

The article is published in author's edition.

Submitted: 18.08.2025

Accepted: 30.12.2025

Contacts: haidersa@shu.edu.iq

Abstract

Introduction. Patients with burns and wound injuries face a higher risk of contracting nosocomial infection due to having partial or complete loss of the skin barrier and a weakened immune system that makes delivery of immediate specialized care a necessity to reduce the rates of mortality and morbidity.

Purpose. To isolate *S. aureus* and *P. aeruginosa* and look into antibiotic resistance of isolated and investigate the existence of resistance genes in both isolates.

Materials and methods. A hundred samples were obtained from patients attending hospitals in Thi-Qar province during the period 22 Oct 2024 to 25 Mar 2025. All samples were directly cultured on enrichment media, and biochemical tests were done. VITEK systems I and II were carried out in the microbiological laboratory. Applying the disk diffusion technique, the antibiotic sensitivity test was investigated. Finally, the presence of Betalactamase-resistance genes was molecularly studied.

Results. Thirty-four isolates from 100 samples were found as *P. aeruginosa* and *S. aureus* was found in 23 isolates. The results discovered that the antibiotic resistance genes *mecA* and *blaZ* were detected in 12 tested *S. aureus* isolates. In contrast, the *mexA* and *ampC* genes were detected in 8 tested *P. aeruginosa* isolates.

Conclusion. Every isolate of *S. aureus* and *P. aeruginosa* are antibiotic-resistant and demonstrated that the frequency of antibiotic resistance in burn and wound patients is alarmingly high.

Keywords: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, antibiotics resistance, MDR, PCR, XDR



Али Р.Х.¹, Джарулла А.Б.², Абдулхусейн С.Х.²✉

¹ Педагогический колледж, Университет Аль-Шатра, Аль-Шатра, Ирак

² Ветеринарный колледж, Университет Аль-Шатра, Аль-Шатра, Ирак

Идентификация мультирезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* у пациентов с ожогами и ранами

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Али Р.Х. – концепция, обработка данных, проведение исследований, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, написание чернового варианта статьи, редактирование; Джарулла А.Б. – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, написание чернового варианта статьи, редактирование; Абдулхусейн С.Х. – концепция, обработка данных, проведение исследований, ведение проекта, ресурсы, написание чернового варианта статьи, редактирование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 18.08.2025

Принята: 30.12.2025

Контакты: haidersa@shu.edu.iq

Резюме

Введение. Пациенты с ожогами и ранами подвержены повышенному риску развития внутрибольничной (нозокомиальной) инфекции вследствие частичного или полного разрушения кожного барьера и ослабления состояния иммунной системы, что делает оказание им патогенетически обоснованной и своевременной специализированной медицинской помощи необходимым условием быстрого выздоровления, а также снижения заболеваемости и смертности при таких формах патологии.

Цель. Выделить *S. aureus* и *P. aeruginosa* и установить наличие у микроорганизмов наличие генов резистентности к антимикробным препаратам.

Материалы и методы. Исследовано 100 образцов клинического материала, полученного от пациентов, обратившихся в стационарные медицинские учреждения (больницы) провинции Ти-Кар в период с 22 октября 2024 г. по 25 марта 2025 г. Все образцы материала культивировались прямым способом в питательных средах с последующим проведением биохимического исследования, для чего в микробиологической лаборатории использовались системы VITEK I и II (bio Merieux). Методом дисковой диффузии определялась восприимчивость к антибиотикам. На заключительном этапе работы было проведено молекулярное исследование на предмет установления наличия генов устойчивости к бета-лактамазам с использованием ПЦР-анализа.

Результаты. В 34 из 100 исследованных образцов были обнаружены *P. aeruginosa*, в 23 – *S. aureus*. Результаты исследования показали наличие антибиотикорезистентности *mecA* и *blaZ* в 12 изолятах *S. aureus*. Гены *mecA* и *ampC* были выявлены в 8 исследованных изолятах *P. aeruginosa*.

Заключение. Установлено, что все полученные в ходе исследования изоляты *S. aureus* и *P. aeruginosa* являются антибиотикорезистентными, что объясняет констатированную высокую частоту встречаемости антибиотикорезистентности у пациентов с ожогами и ранами.

Ключевые слова: синегнойная палочка, стафилококк, устойчивость к антибиотикам, мультирезистентность, ПЦР, экстремальная лекарственная устойчивость

■ INTRODUCTION

Resistance to antibiotics (AMR) is presently regarded by the World Health Organization as one of the main risks to public health worldwide (WHO), especially since multidrug-resistant (MDR) bacterial infections are spreading throughout the world [1]. Antibiotic overuse and misuse include but are not limited to incomplete treatment, inappropriate prescription, and self-medication. Low-quality medications may not contain sufficient active substances or the correct dose, resulting in inadequate therapy and the development of resistance. These systems enable microorganisms to endure attacks from antibiotics and other antimicrobial chemicals that often hinder their development or cause their complete demise. Typical resistance mechanisms involve enzymatic modification or degradation of antibiotics, limiting the entry of antibiotics into cells to prevent their build-up [2, 3]. Bacteria may also create biofilms, surface-bound communities with varying nutrition levels and limited antibiotic penetration [4]. Due to their increased resistance to medicines, disinfectants, and the body's immune system, bacterial biofilms are the cause of chronic infections. Other significant biofilm characteristics are a gradient of oxygen and nutrition from the top layer to the bottom layer of biofilms. The gradients are associated with prolonged doubling rates and lower metabolic activity of bacterial cells, which are the quiescent cells that contribute to certain antibiotic resistance [5]. A common part of the body's microbes, but *S. aureus* is a spherically shaped, Gram-positive bacteria. These bacteria can be voracious despite living commensally on humans, which may cause skin infections and food poisoning. Beta-lactam drugs are the major source of resistance for MRSA, an antibiotic-resistant (mostly methicillin-resistant) strain of *S. aureus* [6, 7]. Although methicillin is no longer Methicillin-resistant *S. aureus*, that is still in use in healthcare, is resistant to commonly used antibiotics such beta-lactams, like oxacillin (MRSA). Because it may develop resistance to any antibiotic that it is exposed to, it presents a significant risk to human health. Scientists can determine the mutations responsible for the emergence of resistance and its spread by doing core and pan-genome analyses of these antibiotic-resistant MRSA strains [8].

P. aeruginosa is a very important Gram-negative bacteria that mainly inhabits the hospitals and is the primary cause of nosocomial infections there [9, 10]. At the same time, it causes opportunistic infections in a variety of hosts, such as people, animals, and plants, to demonstrate its pathogenicity. Because *P. aeruginosa* may live in a variety of environmental settings and is resistant to current antimicrobial treatments, treating it can be difficult [11]. The ability of *P. aeruginosa* to develop biofilms, a complex process in which bacteria group together inside an extracellular matrix that they manufacture on their own, is one of its distinguishing characteristics and a major factor in its clinical impact [12]. Antibiotic resistance is mostly caused by *P. aeruginosa*, which is notable for being listed on the WHO list of "priority pathogens" [13].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To isolate *S. aureus* and *P. aeruginosa* and look into antibiotic resistance of isolated and investigate the existence of resistance genes in both isolates.

■ MATERIALS AND METHODS

Sampling

One hundred specimens of different age groups for clinical sources (Burns, Wounds) were collected from patients of Hospitals in Thi-Qar province, Iraq. The permission



and ethical approval were received from the Thi-Qar health directorate (number 11415, on January 20, 2025). The collected specimens were cultured, and further studies were performed in the Microbiology Lab. at the College of Veterinary Medicine, Shatrah University, Iraq. Samples were taken from burn injuries of the first- second -and third degree, according to the doctors' diagnosis, as well as injuries of skin wounds and bacterial infections after operations, diabetic foot, and amputations.

Isolation and Identification

All samples were directly cultured on blood agar, MacConkey agar, and Mannitol Salt Agar in order to isolate and specific identify respectively, *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and incubated for 24h at 35 °C [14]. The necessary examinations and testing for an initial diagnosis of the developing bacterial culture on isolates were carried out. Also, both of bacterial (*P. aeruginosa* and *S. aureus*) colonies growing on blood agar showed the ability to produce hemolysin of type beta-hemolysis, Gram stain, catalase, oxidase, coagulase and peroxidase tests were conducted [15].

Antibiotics Sensitivity

According to the 2023 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations, the Kirby – Bauer disc diffusion technique and interpretation rules were used to conduct antibiotic sensitivity testing (AST) [16]. A bacterial suspension was prepared by taking five to six bacterial colonies and suspend them in 5ml sterilized distil water then mix by a vortex in order to compare and adjust their turbidities to 0.5 McFarland standard by adding more colonies or more water 0.5McFarland standard is equivalent from 1×10^8 to 2×10^8 CFU/ml of a bacterial suspension. And then the bacterial suspension swabbed on the Muller – Hinton agar. The plates were permitted to dry at room temperature; Antibiotic disks were positioned on the agar surfaces using sterile forceps. Incubation at 37 °C for 24 h and the results were recorded depending on standard interpretative measures of inhibition zone. Depending on Clinical and Lab. Standards Institute (CLSI) guidelines A Set of 11 Tests were conducted on antibiotic discs from various classes against *S. aureus* isolates which included: Ampicillin (25 µg), Cefixime (5 µg), Erythromycin (10 µg), Cephalexin (30 µg), Vancomycin (30 µg), Clindamycin (10 µg), Fusidic Acid (20 µg), Rifampin (5 µg), Tobramycin (10 µg), Gentamicin (10 µg), and Meropenem (10 µg). However, Ampicillin (25 µg), Cefixime (5 µg), Ceftazidime (30 µg), Erythromycin (10 µg), Imipenem (10 µg), Tetracycline (30µg), Rifampin (5 µg), Tobramycin (10 µg), Amoxicillin-Clavulanate (30 µg), and Clindamycin (10 µg) were used against *P. aeruginosa*. The bacterial growth turbidity was adjusted to 0.5 McFarland standards, (density of $[1.5 \times 10^8]$ cell/mL) and infected all over the Muller – Hinton agar surface (Himedia/India) plate. After that, the plates were left to dry at room temperature, Following the placement of antibiotic discs on each 100 mm plate, the plates were incubated for eighteen hours at 35 °C. Following incubation, the plates were read, the antibiogram was calculated using the CLSI criteria, and the width of the inhibitory zones was measured in millimeters [16, 17].

VITEK System I and II

VITEK automated I and II systems were performed in microbiology laboratory; to identify antibiotic-resistant bacteria, a total of 57 bacterial isolates were 34 *P. aeruginosa* 23 *S. aureus* by using GN-ID, GP-ID cards [18]. Before testing, each isolate was recultured

in blood gel. Upon incubation for 18 to 24 hours, the bacterial suspension reached McFarland 0.5. GN-ID VITEK® 1, GP-ID cards (bio Merieux) cards were infected in accordance with the manufacturer's instructions. The VITEK system -2 and conventional methods were used to determine the resistance and sensitivity of *P. aeruginosa* toward a broad range of antibiotics [Tigecyclin (TI), Piperacillin / Tazobactam (TZP), Ticarcillin / Clavulanic acid (TIM), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Gentamicin (CN), Amikacin (AK), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP)], and the minimum inhibition concentration (MIC) of each antibiotic were measured against 13 isolates of *P. aeruginosa*. However, Tigecyclin (TI), Oxacillin (OX), Vancomycin (VA), Cefepime (FEP), Rifampicin (RA), Meropenem (MEM), Amikacin (AK), Tobramycin (TOP), Gentamicin (CN), Tetracycline (TE), and Ciprofloxacin (CIP) were used against 8 isolates of *S. aureus* [19, 20].

Molecular Profiling

The genomic bacterial DNA was extracted from Bacterial Culture isolates by using Gene aid Kit for extracting genomic DNA (Taiwan) according to instructions by the manufacturer. Then, extracted DNA from pure cultures was stored frozen at -20 °C. Conventional PCR was employed for the identification and analysis of resistant genes *mexA* and *ampC* in *P. aeruginosa*; *MecA* and *blacZ* in *S. aureus* using primers for each species that have been published shown in Table 1.

Horizontal agarose gel electrophoresis was used to assess the PCR reactions. A 1.5% gel was prepared as described before, and 4 µl of the PCR result was combined with 1 µl of Safe-Gree Dye (abm) before being put into an insertion cavity (pocket). For the length standard, one pocket per row was utilized (100 bp DNA Ladder), volume 4 µl the PCR products' size and concentration were estimated using the length standard. Running the electrophoresis at 60V and 85 mA Following the completion of the electrophoresis run, the gel was exposed to a UV screen to detect the success of the PCR product for studied genes and to know its size compared to the DNA ladder.

RESULTS

Isolation of Bacteria

The results found that the total isolates were 72 isolates of a different genus of bacteria, which 34 (60%) they were *P. aeruginosa* isolates, and 23 (40%) were *S. aureus* based on the morphological features of colonies (size, shape, color, and odor) and the biochemical tests

Table 1
The specific primer used, annealing temperature and the products

Genus	GENE	Primer Sequence	Annealing Tem.	Product Size	Ref.
S. aureus	mecA-F	5CCTAGTAAAGCTCCGGA3	54 °C	314 bp	[21].
	mecA-R	CTAGTCCATTCGGTCCA			
	blaZ-F	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC	57 °C	240 bp	[21].
	blaZ-R	TGACCACTTTTATCAGCAACC			
P. aeruginosa	AmpC-F	GATGAAGGCCAATGACATTCCG	58 °C	742 bp	[22].
	AmpC-R	CATGTGCGCGA3CCTTGTAGTAA			
	MexA-F	CTACGAGGCCGACTACCAGA	59 °C	772 bp	[22].
	MexA-R	TGCAGGCCTTCGGTAATGAT			



that performed during this study. Also, the results of VITEK-I discovered that all bacterial species were belonging to two genes.

Antibiotics Susceptibility

In the Kirby – Bauer Method the results showed different levels of sensitivity against twelve types of antibiotics commonly prescribed and available antibiotics. The results of Antibiotic Sensitivity Test (AST) by using disk diffusion methods found that eight isolates of *S. aureus* (which are including isolates number 13, 14, 18, 19, 29, 21, 22, and 23) exhibited resistance to all eleven tested antibiotics; consequently, it classified as MDR and XDR isolates at the same time. The resistance ration of isolates 1, 2, 4, and 12 was 55%. The least resistance was 27% by isolate number 8 although it was positive to the *blaZ* and *mecA* genes. Furthermore, isolate no.15 showed resistance to all antibiotics except vancomycin and it was intermediated sensitive (I) as shown in Figure 1.

Antibiotics Resistance of Isolated Bacteria

The results showed that the Ampicillin (AM) has the highest resistance at 83.3%, Gentamicin (CN), and Tobramycin have resistance rates of 79.2%. These antibiotics were the least effective against *S. aureus*, indicating a significant challenge for treatment options involving these drugs (Figure 2).

Antibiotics Resistance of Isolated *P. Aeruginosa*

The results elucidated that all of 34 isolates of *P. aeruginosa* exhibited varied levels of resistance to 10 used antibiotics. Mainly, 12 isolates were resistant to all used antibiotics,

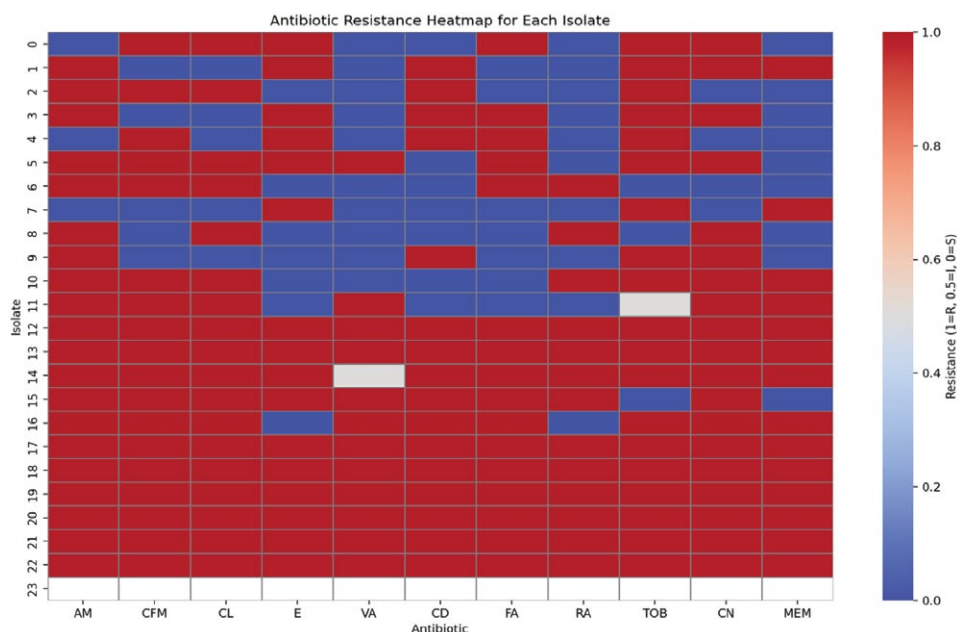


Fig. 1. The heatmap showing antibiotics sensitivity test of *S. aureus* isolates using disc diffusion technique: S (Sensitive – blue), I (Intermediate), R (Resistance – Red)

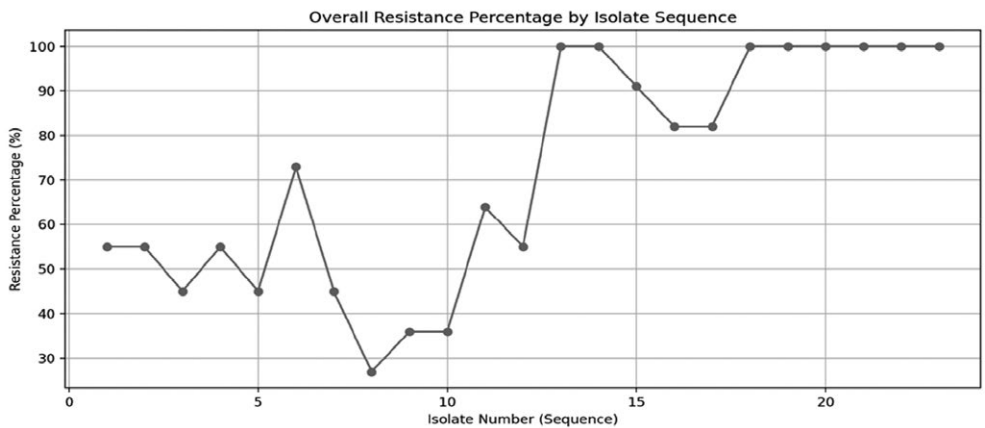


Fig. 2. The chart shows the overall resistance percentage for each isolate in sequence

four isolates exhibited resistance to eight out of 10 antibiotics, six isolate showed resistances to six antibiotics, four isolates demonstrated resistance to five antibiotics, and six isolates were resistance to four antibiotics.

Table 2
The Minimum Inhibition Concentration (MIC) of *P. aeruginosa* isolates

No. Isolates	TI	TZP	CAZ	FEP	IMP	MEM	AK	CN	TOP	CIP
1	12≥ R	8≥ S	64≥ R	64≥ R	16≥ R	8 ≥ S	32≥ S	16≥ R	16≥ S	4≥ R
2	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
3	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
4	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ S	16≥ R	4≥ S	4≥ S
5	12≥ R	64≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ S	16≥ R	16≥ R	4≥ R
6	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
7	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
8	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ S	16≥ R	16 S	64≥ R	16≥ R	16≥ S	4≥ R
9	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	4 R	4≥ R
10	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
11	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16 R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
12	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
13	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64 ≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R



Table 3
Minimum inhibition concentration (MIC) to 11 antibiotics against clinical isolates, used VITEK2 system for *S. aureus*

No. Isolates	TI	OX	VA	FEP	RA	E	AK	CN	TOP	TE	CIP
1	12≥ R	8≥ R	4≥ S	64≥ R	16≥ S	8≥ R	32≥ S	16≥ R	16≥ R	16≥ S	4≥ R
2	12≥ R	12≥ R	64≥ S	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	16≥ S	4≥ R
3	12≥ R	12≥ S	64≥ S	64≥ S	16≥ S	16≥ R	64≥ R	16≥ S	16≥ R	16≥ R	4≥ S
4	12≥ R	64≥ R	64≥ S	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	4≥ R	16≥ S	4≥ R
5	12≥ R	64≥ S	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ S	16≥ R	16≥ R	16≥ S	4≥ R
6	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
7	12≥ R	12≥ R	64≥ S	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	16≥ S	4≥ R
8	12≥ R	12≥ R	64≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	64≥ R	16≥ R	16≥ R	16≥ R	4≥ R
R%	100	75	38	88	75	100	63	88	100	38	88

Antibiotics Resistance Percentage of Isolated *P. Aeruginosa*
The findings of AST of *P. aeruginosa* elucidated that the Ampicillin (AM) has the highest resistance at 91% and was the least effective; whereas, the resistance rates of Clindamycin, Tobramycin, and Imipenem was 85%, 82%, and 79% respectively. Also, the results found that Ceftazidime proved to be the most effective antibiotic against tested *P. aeruginosa*.

Determination of MIC of *P. Aeruginosa*
By using VITEK-II the MICs of each antibiotic were measured against 13 *P. aeruginosa* by and the results found that some isolates are resistance to all antibiotics, as shown in Table 2. The MIC values to 10 antibiotics against 13 Isolates were varies. All Isolates under test showed resistance to Tigecycline, Ceftazidime, and Imipenem. The MICs of AK for isolate no. 1, 4, 5, were 32≥, 64≥, and 64≥ respectively. Also results found that isolates number one was the most affected one. Finally, the result revealed that the isolates 13, 12, 11, 10, 9, 7, 6, 2, 3 were resistant to tested antibiotic by using VITEK-II, as shown in table 2.
The 34 isolates of *P. aeruginosa* showed that were highly resistant to Cefazolin and Tigecycline with a percentage of (100%). While the resisting for Ampicillin, Ceftazidime, Erythromycin, Cephalixin, Clindamycin, Tobramycin, and Meropenem was (50%).

Determination of MIC of *S. Aureus*
The Tigecyclin (TI), Oxacillin (OX), Vancomycin (VA), Cefepime (FEP), Rifampicin (RA), Erythromycin (E), Amikacin (AK), Gentamicin (CN), Tobramycin (TOP), Tetracycline (TE), and Ciprofloxacin (CIP) were used against 8 isolates of *S. aureus* and the results discovered that every isolate examined was resistant to Tigecyclin (TI). While the resisting for Cefepime (FEP), Gentamicin (CN), and Ciprofloxacin (CIP) was 88%; Vancomycin (VA) and Tobramycin

(TOP) were the most effective antibiotics. The current results classified isolates number 6 and 8 are Extensive drug resistant (XDR), whereas the others are varying from multi-drug resistant (MDR) to Pun-drug resistant (PDR) isolates.

The molecular characterization found that *ampC* and *mexA* genes exist only in seven isolates of *P. aeruginosa* with 742 bp and 772 bp, respectively. Whereas, the *blaZ* and *mecA* genes were presented in all tested *S. aureus* isolates, as shown in figures 3.

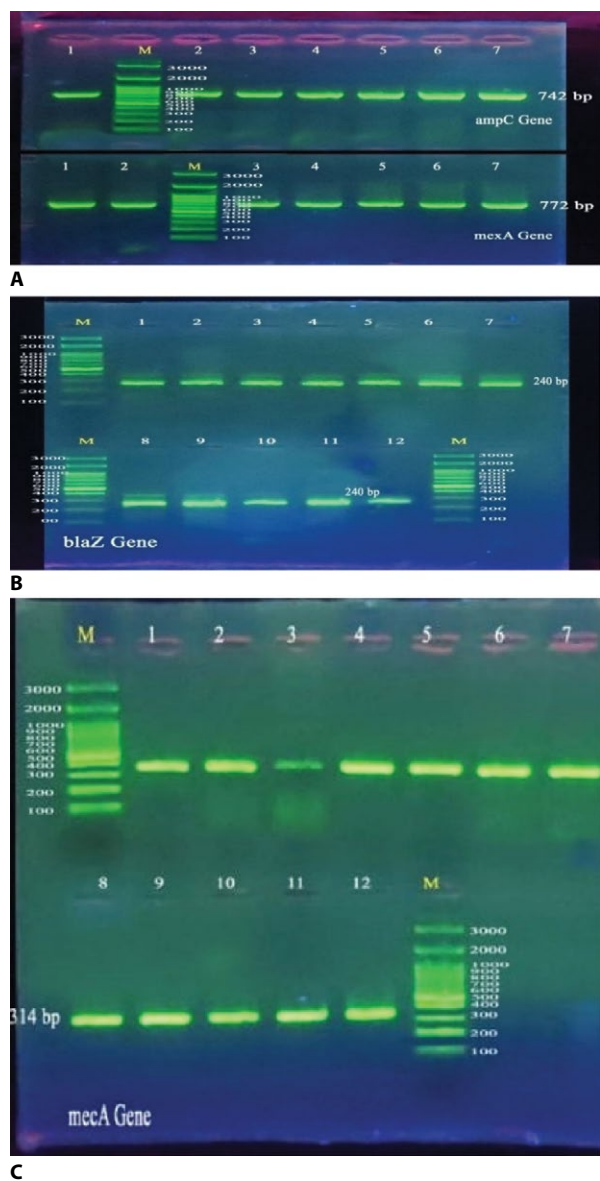


Fig. 3. A – Gel-electrophoresis of amplified PCR product of *mexA* and *ampC* genes in *P. aeruginosa*; B – Gel-electrophoresis of amplified PCR product of *blaZ* gene in *S. aureus*; C – Gel electrophoresis of amplified PCR product of *mecA* gene in *S. aureus*



■ DISCUSSION

The antibiotics resistance of tested *S. aureus* isolates was 78% to Ampicillin, and Fusidic acid; while against all of Erythromycin, Lincosamide, Vancomycin, and meropenem was 65%.

When compared to previous studies our findings demonstrate advancing in resistance bacteria strains, *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different patients including 18 (36%), 13 (26%), 9 (18%), 2 (4%) and 1 (2%) respectively, UTIs, lower respiratory tract infection, wounds and burn infections, otitis media, bacteremia, and meningitis [21]. In all, 42 isolates were gathered, and they were identified as *P. aeruginosa* by using MALDI-ToF and PCR techniques; also, the extensively drug resistant (XDR) and multi-drug resistant (MDR) percentages were detected [22].

Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals in Turkey was collected and the antimicrobial susceptibilities were tested against eight antibiotic disks using agar delusion method [23]. In other investigation in Baghdad province, out of 129 samples 45 bacterial species were isolated and identified as *S. aureus* based on cultural and biochemical characteristics; also, the presence of *mecA* gene was confirmed [24]. In accordance with the National Committee for Clinical Laboratory Standards' recommendations (CLSI 2023) [16, 25], The test for antibiotic sensitivity was conducted for all 57 pure using the Kirby – Bauer technique to isolate (the Disc Diffusion Method) [15] and the Vitek-2 System.

However, the results found that the most effective antibiotic against the same isolates was Rifampicin with 39% of antibiotic resistance. Also, the percentage of antibiotic resistance for Topramycin and Gentamycin was 87% and represent the lowest effective antibiotics. In a previous investigation performed in Iraq, all *S. aureus* isolates showed varied levels of resistance to antibiotics. Particularly, eleven isolates were resistant to all used antibiotics, six isolates exhibited resistance to six out of 12 antibiotics, four isolate showed resistances to nine antibiotics, and two isolates demonstrated resistance to five antibiotics [26]. Our research the results observed that resistance percentages fluctuate among the early isolates; however, there is an obvious cluster of isolates toward the end with 100% resistance.

Mid-range *P. aeruginosa* isolates (≈ 55 –78%) retain sensitivity to only a few drugs. The least-resistant group (≈ 33 –45%) still has several effective treatment options; accordingly, it classified as MDR and XDR isolates at the same time. Furthermore, isolate no.16 showed resistance to all antibiotics except Tobromycin. This result highlights which isolates are the hardest to treat and helps prioritise further testing or alternative therapies. These results are consistent with the guidelines established by the World Health Organization (WHO) [26,27], which has released a list of priority diseases that are resistant to antibiotics, meaning they pose a serious risk to people and are targeted by new medications.

This suggests that, if the isolate numbers are in chronological order, resistance may have increased over time, with a notable group of highly resistant isolates appearing later in the sequence, whereas, the results of AST by using disk diffusion methods found that twelve isolates of *P. aeruginosa* P13, P15, P18–23, P27, P29–34) are fully resistant to every antibiotic tested. Mid-range isolates (≈ 55 –78%) retain sensitivity to only a few drugs. The least-resistant group (≈ 33 –45%) still has several effective treatment options; accordingly, it classified as MDR and XDR isolates at the same time. Furthermore, isolate no.16 showed resistance to all antibiotics except Tobromycin. This result highlights which isolates are the hardest to treat and helps prioritise further testing or alternative therapies. These results

are consistent with the guidelines established by the World Health Organization (WHO) [28], which has published a list of antibiotic-resistant priority pathogens, pathogens that present a great threat to humans and to which new antibiotics.

■ CONCLUSION

The antibiotic resistance genes *cmeA* and *blaZ* are more detected in *S. aureus* isolates, whereas the *mexA* and *ampC* genes are more detected in *P. aeruginosa* isolates. This study reported that all *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates are antibiotic-resistant, showing that the prevalence of antibiotic resistance in patients with burns and wounds is alarmingly high. The resistance is highest for AM, TOB, and CN. These highlights a concerning trend of multidrug resistance among the isolates, emphasizing the need for careful antibiotic stewardship and monitoring.

■ REFERENCES

1. Salam M, Abdus S, et al. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare*. 2023;11(8):1946.
2. Chiş AA, et al. Microbial resistance to antibiotics and effective antibiotherapy. *Biomedicines*. 2022;10(5):1121.
3. Mohanty H, Pachpute S, Yadav RP. Mechanism of drug resistance in bacteria: efflux pump modulation for designing of new antibiotic enhancers. *Folia Microbiol (Praha)*. 2021;66(5):727–39.
4. Uruén C, et al. Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics*. 2020;10(1):3.
5. Shree P, et al. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology*. 2023;16:100084.
6. Enright MC. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):7687–92.
7. Nandhini P, et al. Recent developments in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: a review. *Antibiotics*. 2022;11(5):606.
8. Alghamdi BA, et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi J Biol Sci*. 2023;30(4):103604.
9. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:39.
10. Reynolds D, Kollef M. The epidemiology, pathogenesis, and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs*. 2021;81(18):2117–31.
11. Laborda P, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Curr Opin Microbiol*. 2021;64:125–32.
12. David A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm lifecycle: Involvement of mechanical constraints and timeline of matrix production. *Antibiotics*. 2024;13(8):688.
13. Balakrishnan VS. WHO's first global infection prevention and control report. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(8):1122.
14. Abdulhusein HS, et al. Negative effects of haloversatle bacteria in salt on skins and their control with direct electric current in the leather industry. *J Soc Leather Technol Chem*. 2023;107(6):201–14.
15. Abdulhusein HS, Kadim BM. Molecular characterization and antibiotic sensitivity of *Staphylococcus* sp. isolated from animal skin wounds. *J Educ Pure Sci Univ Thi-Qar*. 2024;14(4):65–74.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2020. CLSI document M100, 30th ed.
17. Kadim BM. Distribution of antibacterial resistance among pathogenic bacterial isolates from patients in Al-Shatrah General Hospital. *Univ Thi-Qar J Agric Res*. 2024;13(2):679–90.
18. Lal UAP, et al. Identification of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* using automated Vitek-2 compact system and D test. *J Med Sci*. 2024;10(2):136.
19. Balouiri M, Sadiki M, Ibnssouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71–79.
20. Lee M, Chung HS. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in Enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion, and broth microdilution. *J Microbiol Methods*. 2015;112:87–91.
21. Al-Bayati SS, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical samples. *Biochem Cell Arch*. 2021;21(2):3931–3935.
22. Habib MB, et al. Decoding MexB efflux pump genes: structural, molecular, and phylogenetic analysis of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;14:1519737.
23. Yıldız Ö, et al. Antimicrobial susceptibility and resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 hospitals in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13(1):1–6.
24. Ghayyib AA, Ahmed IA, Ahmed HK. Isolation, molecular identification, and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* isolates. *HIV Nurs*. 2022;22(4):278–283.
25. Humphries RM, et al. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. *J Clin Microbiol*. 2021;59(12):e00213–21.
26. Sami Awayid H, Qassim Mohammad S. Prevalence and antibiotic resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Iraqi hospitals. *Arch Razi Inst*. 2022;77(3):167–174.
27. Lopes MBS. The 2017 World Health Organization classification of tumors of the pituitary gland: A summary. *Acta Neuropathol*. 2017;134(5):521–535.
28. Shui J, et al. Relationship of biofilm-forming ability with swimming motility, twitching motility, and virulence gene distribution. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2021;50(3):345–351.



<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.020>



Sameer A. Jawad✉, Wathiq A. Aldarghi

Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Expression Patterns of MexAB-OprM Efflux Pump and Virulence Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*: Implications for Antimicrobial Resistance

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Sameer Jawad – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, resources, software, writing – original draft and editing; Wathiq Aldarghi – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, writing – original draft and editing.

The article is published in author's edition.

Submitted: 24.07.2025

Accepted: 08.12.2025

Contacts: Samir.Adel2300m@ige.uobaghdad.edu.iq

Abstract

Introduction. Pathological conditions caused by *Pseudomonas aeruginosa* represent a serious medical challenge, largely due to both intrinsic and acquired mechanisms of antimicrobial resistance manifested by this bacterial agent.

Purpose. To investigate the prevalence and patterns of expression of MexAB-OprM efflux pump genes and virulence genes in clinical isolates, as well as the association with phenotypic antimicrobial resistance.

Materials and methods. A total of 150 clinical specimens were obtained from four hospitals in Iraq, which were then isolated into 48 *P. aeruginosa* isolates (32%). Clinical isolates were identified using traditional microbiological techniques and the VITEK 2 automated system. Antimicrobial susceptibility testing established isolates as sensitive, multidrug-resistant (MDR), or extensively drug-resistant (XDR). Resistance genes and virulence genes were detected by PCR while the expression of those genes was studied using qRT-PCR.

Results. All isolates harbored mexB, MexA and OprM genes. ExoS was present in 80% of isolates, while ToxA was found in all. In the gene expression analysis among the isolates, there was a progressive increase in expression from sensitive, to MDR, to XDR isolates. There were also significant positive associations between the expression of genes of both efflux pumps and virulence.

Conclusion. The universal presence of MexAB-OprM efflux pump genes and the high presence of virulence genes indicated that they may have a role in treatment failure. The progressive increase in expression pattern with resistance category show a stepwise acquisition for resistance capabilities among the isolates, and the MexAB-OprM efflux pump system may be a central figure.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-OprM, antimicrobial resistance, virulence genes, gene expression

Самир А. Джавад✉, Ватик А. Альдарги

Институт повышения квалификации специалистов в области генной инженерии и биотехнологий, Багдадский университет, Багдад, Ирак

Уровень экспрессии генов эффлюксной системы (помпы) MexAB-OprM и генов вирулентности в клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa*: предполагаемое влияние на устойчивость к антимикробным препаратам

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Самир Джавад – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, ресурсы, программное обеспечение, написание чернового варианта статьи, редактирование; Ватик Альдарги – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, написание чернового варианта статьи, редактирование.

Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 24.07.2025

Принята: 08.12.2025

Контакты: Samir.Adel2300m@ige.uobaghdad.edu.iq

Резюме

Введение. Вызываемые *Pseudomonas aeruginosa* патологические состояния представляют серьезную медицинскую проблему, во многом обусловленную как собственными, так и приобретенными механизмами проявления бактериальным агентом резистентности к антимикробным препаратам.

Цель. Изучить распространенность и особенности экспрессии генов эффлюксной системы MexAB-OprM и генов вирулентности в клинических изолятах *Pseudomonas aeruginosa*, а также их связь с фенотипической антимикробной резистентностью.

Материалы и методы. Исследованию подлежало 48 изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из 150 образцов (32%) клинического материала, поступившего из четырех стационарных медицинских учреждений (больниц) Ирака. Возраст исследованных пациентов составил 5–75 лет; большинство из них были в возрасте 41–60 лет. Клинические изоляты идентифицировались с использованием как традиционных микробиологических методов исследования, так и с применением автоматизированной системы VITEK 2 (bioMérieux, France). С целью определения, являются ли изоляты чувствительными, либо множественно-лекарственно-устойчивыми (MDR), либо экстремально-лекарственно-устойчивыми, были проведены тесты на предмет установления чувствительности микроорганизма к классическим антибактериальным препаратам. Гены резистентности и вирулентности идентифицировались методами ПЦР-анализа, а экспрессия этих генов исследовалась с использованием qRT-PCR.

Результаты. Установлено, что все изоляты содержали гены mexB, MexA и OprM. Ген *EcoS* присутствовал в 80% изолятов, *ToxA* был выявлен во всех образцах клинического материала. Анализ экспрессии генов показал нарастание экспрессии от чувствительных изолятов к мультирезистентным (MDR) и изолятам с экстремальной резистентностью (XDR). Выявлена достоверная положительная корреляция между экспрессией генов эффлюксных насосов и вирулентностью.



Заключение. Констатировано широкое распространение генов системы эффлюксного насоса MexAB-OprM и генов вирулентности, указывающее на то, что они могут иметь отношение к снижению эффективности лечения. Последовательное нарастание экспрессии генов с повышенной устойчивостью микроорганизмов к антимикробным препаратам свидетельствует о поэтапном усилении процесса формирования резистентности изолятов к антимикробным препаратам; при этом система эффлюксного насоса MexAB-OprM, возможно, играет в этом процессе центральную роль.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-OprM, устойчивость к антибиотикам, гены вирулентности, экспрессия генов

■ INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative opportunistic pathogen that is commonly found in nature and infects a wide range of wounds, particularly in immunocompromised patients [1]. Its extreme ability to survive and develop intrinsic resistance has made it one of the most notoriously virulent pathogens causing healthcare-associated infection, with an estimated 51,000 infections each year [2].

The World Health Organization has classified carbapenem-resistant *P. aeruginosa* as critical priority pathogen to develop new antibiotics [3]. The clinical impact of *P. aeruginosa* is significant across medical disciplines with particularly severe consequences in immunocompromised patients, and in intensive care involved with ventilator-associated pneumonia. Mortality rates exceed 30% despite appropriate antimicrobial therapy [4].

A primary resistance mechanism in *P. aeruginosa* is the MexAB-OprM efflux pump system that plays a major role in pushing antibiotics out of the bacterial cell [5]. The MexAB-OprM system is a tripartite system, consisting of MexA – membrane fusion protein, MexB – inner membrane transporter, OprM – outer membrane channel, which forms a large, sophisticated machinery and contribute to the multidrug resistant phenotype.

Aside from antibiotic resistance, the virulence determinants of *P. aeruginosa* are numerous and affect its ability to colonize a host, invade tissue, and evade the immune system. The main exotoxins of *P. aeruginosa*, ExoS and ToxA, are known to be among the principal contributors to the pathogenesis in this organism. ExoS is a bifunctional toxin capable of GTPase-activating protein, and ADP-ribosyltransferase activity, and is responsible for altering a number of host cell functions to facilitate bacterial invasion [2]. ToxA binds elongation factor 2 in host cells to ADP-ribosylate them and inhibit protein synthesis, ultimately resulting in host cell death [6].

The relationship between virulence and antibiotic resistance in *P. aeruginosa* is still being studied. Historically there has been an assumption that the acquisition of resistance comes at a fitness cost. Studies now suggest that there are virulence traits that are either compatible with antibiotic resistance or in some cases more virulent than strains that aren't resistant to antibiotics [7].

This study has examined the prevalence and expression profile of known resistance genes (mexB, MexA, OprM) and virulence genes (ExoS, ToxA) in clinical isolates of *P. aeruginosa*, and the potential relationship with antimicrobial resistance phenotypes.

Understanding how these mechanisms work, could contribute to the development of treatment strategies required to better manage *P. aeruginosa* infections.

■ PURPOSE OF THE STUDY

To investigate the prevalence and patterns of expression of MexAB-OprM efflux pump genes and virulence genes in clinical isolates, as well as the association with phenotypic antimicrobial resistance.

■ MATERIALS AND METHODS

Study Design and Sample Collection

The cross-sectional study involved 150 undergraduate specimens that were collected between October 2025 and March 2025 from four hospitals in Iraq. All specimens were obtained from patients who were admitted to the hospital and were both female and male patients age 5–75 years old. The type of specimens that were collected included burns (n=42), wounds (n=38), ear swabs (n=27), sputum (n=23), urine (n=12) and blood (n=8). This study was conducted after institutional ethics committee approval (approved number: ETH-2025-143).

Bacterial Isolation and Identification

Specimens were processed following standard microbiological procedures. Suspected *P. aeruginosa* colonies were identified based on morphological characteristics and biochemical tests conducted including oxidase, catalase, indole production, methyl red, Voges – Proskauer, citrate utilization, and 42 °C growth. Confirmation was done by VITEK 2 automated system (bioMérieux, France) GN ID cards [8].

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing was completed with the Kirby-Bauer disk diffusion method, according to CLISIm [9], selecting the following antibiotics for testing: piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin, and colistin. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined for selected antibiotics using the broth microdilution method.

Isolates were defined as sensitive, multidrug-resistant (MDR), or extensively drug-resistant (XDR) based on standardized international definitions [10]. MDR is defined as non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories, and XDR is defined as non-susceptibility to at least one agent in all but two or fewer antimicrobial categories.

Molecular Detection of Resistance and Virulence Genes

To extract genomic DNA, the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) was used. Conventional PCR was subsequently performed to detect resistance encoded genes, namely: *mexB*, *MexA* and *OprM*, and virulence encoded genes, namely: *ExoS* and *ToxA*, using specific primer pairs (Table 1). PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels using electrophoresis [11].



Table 1
Primers used for gene detection

Target Gene	Primer Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)
mexB	F: GTGTTCGGCTCGCAGTACTC AACCGTCGGGATTGACCTTG	280
MexA	F: CTCGACCCGATCTACGTCATC GTCACCGTGTTCGACGTTAC	503
OprM	F: GATCCCCGACTACCAGCGC ATGCGGTACTGCGCCAG	247
ExoS	F: CGTCGTGTTCAAGCAGATGGTGCTG CCGAACCGCTTCACCAGGC	129
ToxA	F: GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	396
fbp (reference)	F: TGCCAGAACATCACCTCG ACGACGGCTTCCTCAAGCA	178

Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted from representative isolates using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany). First strand cDNA was synthesized using the SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher Scientific, USA). Quantitative real-time PCR was performed to determine expression levels of resistance and virulence genes using PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA).

The fbp gene encoding fructose-1,6-bisphosphatase was used as the housekeeping reference gene for normalization. The relative expression levels were subsequently calculated using the 2^{^(-ΔΔCT)} method as outlined [12].

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS 26.0 (IBM Corp., USA). The categorical variables were compared using Pearson Chi-Square or Fisher’s exact test. One-way ANOVA with Tukey’s post hoc test was used to compare gene expression levels for resistance categories. Spearman’s rank correlation coefficient was used to assess relationships between the levels of gene expression and the MIC results. p. values were considered statistically significant at <0.05.

RESULTS

Patient Demographics and Bacterial Isolation

Out of 150 clinical specimens, 48 isolates (32%) were identified as *P. aeruginosa*. The majority of patients were aged between 41–60 years (43.8%) with a slight majority of male patients (54.2%). Burns represented the most common sources of infection (33.3%) followed by wounds (25.0%), ear swabs (16.7%), sputum (14.6%), urine (6.3%), and blood (4.2%).

All isolates were identified based on colony morphology on a variety of culture media, with all isolates being positive on oxidase and catalase test, however 0% positive for indole, methyl red, and Voges – Praskauer tests and 95% positive for citrate utilization and growth at 42 °C. VITEK 2 identified isolates with 99% accuracy.

Antimicrobial Susceptibility Patterns

Antimicrobial susceptibility testing displayed variable resistance to different classes of antibiotics. The highest resistance rates were seen for piperacillin (54.2% resistance), ciprofloxacin (50.0% resistance) and ceftazidime (47.9% resistance). Colistin had the best activity against the isolates with only 4.2% resistance.

In terms of resistance profiles, 19 isolates (39.6%) were susceptible, twenty-one (43.8%) were classified as MDR and eight (16.7%) were typed as XDR. MDR and XDR isolates were more often recovered from burns (75.0% MDR/XDR) and wounds (66.7% MDR/XDR) than other specimen sources (p=0.042).

Prevalence of Resistance and Virulence Genes

The molecular analysis showed that all three elements of the MexAB-OprM efflux is comprised of mexB, MexA, and OprM were detected in all 48 P. aeruginosa isolates (100%). For virulence genes, ToxA was present in all isolates (100%) while ExoS was present in 38 isolates (79.2%).

The findings did indicate different prevalence patterns of ExoS among the resistant profiles: 89.5% in sensitive isolates, 76.2% in MDR isolates and 62.5% in XDR isolates, but these differences did not reach statistical significance (p=0.247).

Gene Expression Analysis

The quantitative analysis of transcripts via real-time PCR exemplified the differential gene expression profiles across resistance categories (Table 2). In the sensitive isolates, the levels of virulence and efflux-related gene transcripts were relatively low. The MDR isolates showed significantly higher levels of efflux gene transcripts, especially MexB (1.9-fold increase compared to sensitive isolates, p=0.003), and a moderate increase in virulence gene transcripts. Overall, expression levels of genes in the XDR isolates were considerably higher than other groups, with a 3.4-fold increase in MexB (p<0.001), a 2.6-fold increase in MexA (p<0.001), and a 3.0-fold increase in OprM (p<0.001) compared to the sensitive isolates. The virulence gene expression also increased significantly; the ExoS expression had been increased by 2.1-fold (p=0.007) and the ToxA expression has increased by 4.2-fold (p<0.001).

Correlation analyses showed significant positive correlation of MexB expression with ExoS expression (r=0.62; p=0.005) and ToxA expression (r=0.71; p=0.001). Multivariate logistic regression showed that MexB expression was an independent predictor for both MDR (adjusted OR=2.87; 95% CI: 1.45–5.68; p=0.002) and XDR (adjusted OR=4.23; 95% CI: 1.89–9.47; p<0.001) phenotypes.

Table 2
Mean relative expression levels of resistance and virulence genes

Gene	Sensitive Isolates	MDR Isolates	XDR Isolates	p-value
MexB	3.64±0.87	6.91±1.24	12.36±2.18	<0.001
MexA	1.59±0.42	2.87±0.63	4.12±0.95	<0.001
OprM	0.92±0.25	1.45±0.38	2.76±0.72	<0.001
ExoS	1.18±0.31	1.75±0.48	2.43±0.67	0.007
ToxA	0.45±0.12	0.98±0.27	1.87±0.51	<0.001



■ DISCUSSION

The present study provided insight into the occurrence and distribution of MexAB-OprM efflux pump genes and virulence genes in clinical *P. aeruginosa* isolates, and their association with antimicrobial resistance phenotypes. Our findings provide important information on the molecular mechanisms associated with antimicrobial resistance and virulence in this important opportunistic pathogen.

The isolation rate (32%) of *P. aeruginosa* infection in our study conforms to the 32–36% reported in recent surveillance reports [13]. The predominant isolation of *P. aeruginosa* in burns and wounds is consistent with the demonstrated preferential association of *P. aeruginosa* with moist habitats as well as its recognition as a major pathogen in burn wound infections [14].

Epidemiological review showed a slight male predominance with the greatest prevalence within the age-strata of 41–60 years, which reaffirms previous reports [7]. Findings of diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease and immunosuppression as common comorbid conditions further supports the opportunistic activity for this pathogen, as well as its potential to cause infections among susceptible hosts [4].

The 43.8% of isolates classified as MDR and 16.7% as XDR clearly outline the formidable task in battling antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. The prevalence of these resistance phenotypes is comparable to those studies published recently from the same physical region [2, 7], but this appears to be higher than those published in association with globally normalized statistics. These high values could suggest either a greater level of antibiotic selection pressure in the study geographical region or the possibility of a continuation of resistant clones being passed from person to person.

The occurrence of resistance phenotypes by specimen source is also very similar to previous studies, showing that burns and wounds had higher rates of MDR and XDR isolates [14]. This could be a consequence of the intensive use of antimicrobial agents for burns and wounds, as well as possibly the biofilm structure of *Pseudomonas aeruginosa* and the difficulties in reaching the drug concentrations at these infection sites during acute infections.

Our analysis of resistance and virulence genes demonstrated the ubiquitous presence of MexAB-OprM efflux pump genes present among all isolates, which is not surprising given their chromosomal nature and function in intrinsic resistance [15]. Furthermore, the high prevalence of virulence genes, particularly ToxA (100%) and ExoS (79.2%), aligns with previous reports [2] and underscores their conservation and possible importance for pathogenesis.

We found the gene expression results to be the most significant finding in our study. The findings of our analysis demonstrate that resistance and virulence gene expression increased as resistance category increased (from sensitive to MDR to XDR isolates). The stepwise increase was most pronounced for MexB and it increased by 1.9-fold from sensitive to MDR isolates and another 1.8-fold from MDR to XDR isolates.

We also observed a strong correlation between MexB and other virulence gene expression, particularly with ToxA ($r=0.716$). This suggests that there are likely regulatory connections between resistance mechanism and virulence mechanism expression. This correlation is inconsistent with the idea that there is a fitness cost associated with acquiring resistance, and raises an interesting possibility that these resistance mechanisms could coexist with, or strengthen virulence characteristics in *P. aeruginosa*.

The co-expression of resistance and virulence determinants described in our study has important clinical implications. MDR and XDR isolates not only present therapeutic challenges - given the limitations of treatment options - but also may result in more severe infections with more tissue damage and systemic effects that correlate with higher production of virulence factors.

The finding that MexB expression is an independent predictor of MDR and XDR phenotypes highlights the importance of the MexAB-OprM efflux system in antimicrobial resistance, and therefore represents a viable target for therapeutic intervention. Efflux pump inhibitors may be potentially useful as adjuncts to traditional antibiotic therapy for the treatment of *P. aeruginosa* infections that are mediated by efflux [7].

■ CONCLUSION

Our research findings provide evidence for the prevalence of MexAB-OprM efflux pump genes, and virulence genes among clinical isolates of *P. aeruginosa*. The fact that the gene expression increased from susceptible to MDR to XDR isolates indicates that resistance capabilities were acquired in a stepwise manner, with MexAB-OprM efflux system being a central contributing factor. Moreover, the correlation between efflux pump expression and virulence gene expression indicates that resistance mechanisms and the virulence of *P. aeruginosa* represents a balance that is important to consider in terms of pathogenesis, clinical aspect and drug development. Targeting the MexAB-OprM efflux system, and developing inhibitors for the MexB protein of the MexAB-OprM system are viable intervention strategies to address the developing global antimicrobial resistance crisis.

■ REFERENCES

1. Qin X, Zhou C, Zerr DM. Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Confers an Advantage in the Competition for Environmental Resources. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88(9):e02394–21.
2. Yin Y, Chen H, Li S. Molecular Epidemiology and Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in China: A Nationwide Surveillance Study. *Lancet Microbe*. 2025;6(1):e45–54.
3. World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva: WHO; 2018.
4. Reynolds CA, Kollef MH. Prevention of Hospital-Acquired Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2021;42(6):765–73.
5. Yarahmadi A, Najafiyani H, Yousefi MH, et al. Beyond antibiotics: exploring multifaceted approaches to combat bacterial resistance in the modern era: a comprehensive review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2025;15:1493915.
6. El-Baghdady KZ, El-Borhamy MI, Abd El-Ghaffar HA. Prevalence of Resistance and Toxin Genes in Community-Acquired and Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Clinical Isolates. *Iran J Basic Med Sci*. 2020;23(10):1251.
7. Habib S, Morrissey I, Khurshid M. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2020;79(2):456–68.
8. Aziz RA, Sameer E. Molecular Detection of Antibiotic Resistance Genes and Biofilm Production among Uropathogenic Bacteria. *Syst Rev Pharm*. 2020;11(10):1018–38.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100-S35). Wayne, PA: CLSI; 2025.
10. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
11. Al-Draghi H, Al-Badawi A. Molecular Detection for Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* and Its Relationship with Multidrug Resistance, Isolated from Hospitals Environment. *Medico-Legal Update*. 2020;20(1):1–7.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
13. Wood SJ, Kuzel AR, Guron GKP. *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of Virulence Factors, Biofilm Formation, Antibiotic Resistance, and Therapeutic Options. *Antibiotics*. 2023;12(2):297.
14. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. *Pseudomonas aeruginosa* and the Cystic Fibrosis Airway Microbiome. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2019;5(1):22–9.
15. Lorusso A, Vitale F, Cosenza M. Overexpression of the MexAB-OprM Efflux Pump System in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;59(1):106467.



Смирнов С.Ю., Медведь А.В., Карпейчик Ю.В., 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

Разработка методов диагностики аденокарциномы легкого на основе детекции циркулирующей опухолевой ДНК с использованием технологии цифрового капельного ПЦР-анализа

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Смирнов С.Ю. – концепция исследования, анализ полученных данных, редактирование; Медведь А.В., Карпейчик Ю.В. – 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: 18.08.2025

Принята: 23.12.2025

Контакты: helen_suboch@mail.ru

Резюме

Введение. Рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в мире. Вместе с тем данная локализация характеризуется одним из самых широких спектров молекулярных мишеней, позволяющих индивидуализировать тактику лечения. Однако ограниченное количество и низкое качество биологического материала, полученного при тканевой биопсии, значительно сужают возможности генетического тестирования. В настоящее время все большую популярность в качестве альтернативного малоинвазивного метода изучения молекулярно-генетических характеристик опухоли приобретает жидкостная биопсия, основанная на анализе циркулирующей опухолевой ДНК. Разработка и внедрение в клиническую практику методов детекции цоДНК является высокоактуальным направлением в современной онкологической практике.

Цель. Разработать малоинвазивные методы детекции цоДНК с генетическими нарушениями BRAF V600E, KRAS G12C, EGFR L858R у пациентов с аденокарциномой легкого с использованием кастомных олигонуклеотидов.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила опухолевая ткань (FFPE) и плазма крови 15 пациентов с аденокарциномой легкого, проходивших генетическое тестирование на базе онкологического отделения (генетики) РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова с помощью аллель-специфичной ПЦР. Образцы ДНК с наличием (n=9) и отсутствием (n=6) патогенных вариантов BRAF V600E, KRAS G12C и EGFR L858R включены в исследование в качестве положительных и отрицательных контролей. Разработка методов детекции цоДНК проводилась с использованием технологии цифровой капельной ПЦР.

Результаты. В ходе отработки методик детекции вариантов BRAF V600E, KRAS G12C и EGFR L858R установлены оптимальные значения температуры отжига и концентрации праймеров/зондов, загрузочные концентрации ДНК, а также подтверждена высокая специфичность (100%) и аналитическая чувствительность реакций (BRAF V600E – 0,1%, EGFR L858R – 0,1%, KRAS G12C – 1%).

Заключение. Разработаны методы детекции цодНК аденокарциномы легкого с распространенными генетическими нарушениями в генах BRAF, KRAS и EGFR с использованием кастомных олигонуклеотидов и зондов и технологии цифровой капельной ПЦР. Методы могут быть использованы для диагностики немелкоклеточного рака легкого при отсутствии возможности исследования опухолевой ткани пациентов, а также в научных исследованиях по оценке минимальной остаточной болезни и мониторингу эффективности проводимого лечения.

Ключевые слова: аденокарцинома легкого, жидкостная биопсия, циркулирующая опухолевая ДНК, BRAF, KRAS, EGFR

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

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

Elaboration of Diagnostic Methods for Lung Adenocarcinoma Based on Circulating Tumor DNA Detection Using Digital Droplet PCR Technology

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Smirnou S. – research concept, data analysis, editing; Miadzvedz A., Karpeichyk Y. – data analysis, data interpretation; Pivavarchyk S., Vakhomchyk T., Karatkevich P. – collection and processing of biological material, manuscript preparation for printing; Subach H., 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 № M23RSF-131. The authors did not receive financial support from companies manufacturers of materials and medical equipment used in the study.

Submitted: 18.08.2025

Accepted: 23.12.2025

Contacts: helen_suboch@mail.ru

Abstract

Introduction. Lung cancer is one of the leading causes of cancer incidence and mortality worldwide. This localization is characterized by one of the broadest spectra of molecular targets, enabling personalized treatment strategies. However, limited and low-quality tissue biopsy material significantly restricts genetic testing capabilities. Currently, liquid biopsy based on the analysis of circulating tumor DNA is gaining popularity as an alternative minimally invasive method for studying molecular genetic characteristics of tumors. Elaborating and implementing methods for ctDNA detection in clinical practice is a highly relevant direction in modern oncology practice.

Purpose. To elaborate low-invasive methods for detecting ctDNA with genetic alterations BRAF V600E, KRAS G12C, and EGFR L858R in patients with lung adenocarcinoma using custom oligonucleotides.

Materials and methods. Tumor tissue (FFPE) samples and blood plasma from 15 patients with lung adenocarcinoma undergoing genetic testing at the Oncology Department (genetics) of the N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus were used. Genetic testing was performed using allele-specific PCR. DNA samples with (n=9) and without (n=6) pathogenic variants BRAF V600E, KRAS G12C, and EGFR L858R served as positive and negative controls. Detection methods for ctDNA were elaborated using the digital droplet PCR.

Results. While elaborating detection protocols for BRAF V600E, KRAS G12C, and EGFR L858R variants, optimal annealing temperatures, primer/probe concentrations and DNA input concentrations were established. Also the high specificity (100%) and analytical sensitivity of the methods were confirmed (BRAF V600E – 0.1%, EGFR L858R – 0.1%, and KRAS G12C – 1%).

Conclusion. Methods for detecting lung adenocarcinoma ctDNA with common genetic alterations in the BRAF, KRAS, and EGFR genes were elaborated, using custom oligonucleotides and probes and digital droplet PCR technology. The methods can be used in non-small cell lung cancer diagnostic when tumor tissue cannot be obtained, as well as in scientific research to assess minimal residual disease and monitor the effectiveness of ongoing treatment.

Keywords: lung adenocarcinoma, liquid biopsy, circulating tumor DNA, BRAF, KRAS, EGFR

■ ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в мире. В 2018 г. в Европе было диагностировано 470 000 новых случаев немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), практически у половины из них установлена IV стадия опухолевого процесса [1].

Основополагающим принципом современной лекарственной противоопухолевой терапии является индивидуализация лечения с учетом молекулярно-генетического профиля опухоли. Стандартным биологическим материалом для проведения генетического тестирования является опухолевая ткань, заключенная в парафиновые блоки (FFPE). Тем не менее сложность выполнения тканевой биопсии, недостаточное количество образца для исследования, гетерогенность опухоли и низкое качество выделяемой ДНК значительно ограничивают возможности ее использования [2, 3].

Альтернативным малоинвазивным методом изучения молекулярно-генетических характеристик опухоли является жидкостная биопсия, предоставляющая возможность осуществления детекции циркулирующей опухолевой ДНК (цодНК) [4–7].

Согласно рекомендациям Международной ассоциации по изучению рака легкого (International Society for the Study of Lung Cancer; IASLC), опубликованным в 2021 г., исследование цодНК в настоящее время считается альтернативным вариантом молекулярного профилирования у пациентов с впервые установленным распространенным НМРЛ [8]. Данная информация также отражена в текущих рекомендациях Национальной всеобщей онкологической сети (National Comprehensive Cancer Network, NCCN, США) по диагностике и лечению НМРЛ (version 7.2025): тестирование

цодНК может быть использовано в случаях недостаточности или невозможности получения опухолевой ткани для молекулярно-генетических исследований [9].

Следует также отметить, что среднее время обработки опухолевого материала значительно превышает таковое для цодНК (9 сут. против 15; $P < 0,0001$) [10].

Одним из наиболее распространенных методов детекции генетических нарушений является цифровая капельная ПЦР (цкПЦР). Данный метод основан на дроблении реакционной смеси на множество мелких капель (Bio-Rad, Rainshure) или распределении ее по большому числу ячеек на физическом носителе (Qiagen) [11, 12]. В результате система детекции обрабатывает каждую каплю/ячейку отдельно, что отражается в значительном росте аналитической чувствительности системы (менее 0,01%).

Большинство производителей систем цкПЦР предлагают готовые коммерческие наборы для детекции ряда генетических нарушений, однако открытость систем в плане использования любых олигонуклеотидов позволяет разрабатывать новые методы или переносить на цкПЦР (после необходимой оптимизации) методы классической ПЦР.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать малоинвазивные методы детекции цодНК с генетическими нарушениями BRAF V600E, KRAS G12C, EGFR L858R у пациентов с аденокарциномой легкого с использованием кастомных олигонуклеотидов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужил биологический материал (опухолевая ткань, плазма крови) пациентов с аденокарциномой легкого, ранее проходивших генетическое тестирование в онкологическом отделении (генетики) РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова (EGFR, KRAS, BRAF).

Выделение ДНК из образцов крови, опухолевой ткани, заключенной в парафин, а также цодНК из образцов плазмы крови (2 мл) проводили с помощью наборов реагентов QIAamp DNA Blood mini kit (Qiagen, Германия), QIAamp DNA FFPE kit (Qiagen, Германия) и MagListo cfDNA kit (Bioneer, Южная Корея) соответственно, согласно инструкциям производителей.

Оценку количества выделенной ДНК выполняли спектрофлуориметрически, а степень очистки (за исключением цодНК) исследовали с помощью спектрофотометра.

Постановку цкПЦР осуществляли на оборудовании QX600 (Bio-Rad, США) с применением готовых мастер-миксов производителя EvaGreen и микса для проб (Bio-Rad, США).

Для цкПЦР использовали наборы праймеров, применяемые в клинической практике онкологического отделения (генетики) для классической ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, позволяющие выявлять следующие генетические нарушения: BRAF V600E, KRAS G12C, EGFR L858R. Последовательности олигонуклеотидов указаны в таблице.

В качестве переменных параметров для цкПЦР были использованы: температура отжига праймеров, концентрация олигонуклеотидов и зондов, концентрация исследуемой ДНК.

Последовательность праймеров и зондов для цкПЦР
Primer and probe sequences for ddPCR

№	Праймер	Последовательность 5-3
BRAF V600E		
1	BRAF_F	TCCACAAAATGGATCCAGAC
2	BRAF_R_Mut	GTGATTTTGGTCTAGCTACGGA
3	BRAF_R_WT	TCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGG
EGFR L858R		
4	858_F_WT	ACCGCAGCATGTCAAGATCA
5	858_R	AGCCTGGTCCCTGGTGTC
6	858_F_mut	TCAAGATCACAGATTTTGTGCG
KRAS G12C		
7	KRAS_F	GCCTGCTGAAAATGACTGAA
8	KRAS_R	TATCGTCAAGGCACTCTTGC
9	KRAS_G12C	FAM-GTTGGAGCTTGTGGCGTA-BHQ1
10	KRAS_WT	FAM-GTTGGAGCTGGTGGCGTAG-BHQ1

Исследования на образцах опухолевой ткани (FFPE) проводили в единичном формате. Среднее количество капель при анализе в данном случае составило 20 000 при использовании мастер-микса EvaGreen и 15000 – для TaqMan-зондов. Реакции для детекции цоДНК ставили в дублях, среднее количество капель при анализе одного образца – 40 000. Пороговый уровень для детекции генетических нарушений во всех случаях >3 положительных сигналов.

РЕЗУЛЬТАТЫ
Градиент температур отжига праймеров

На данном этапе исследования была выполнена постановка цкПЦР для положительного и отрицательного контролей по каждому исследуемому маркеру на температурном градиенте 54–64 °C с использованием стандартной концентрации олигонуклеотидов в 200 nM, для KRAS G12C концентрация зондов составила 250 nM. Примеры результатов градиентной ПЦР представлены на рис. 1.

На диаграмме распределения сигналов для KRAS G12C можно заметить неспецифический продукт амплификации (амплитуда по оси Y 300–400), который присутствует и в классической ПЦР, используемой в нашем отделении (зонд в небольшом количестве связывается с ампликоном дикого типа). Для повышения специфичности в таком случае в реакционную смесь добавляется специальный LNA-блокатор, подавляющий амплификацию целевых ампликонов без мутации. В случае с цкПЦР особенности детекции продуктов реакции системой позволяют дискриминировать данные ампликоны без использования дополнительного реактива.

Для дальнейших этапов отработки методик были выбраны температуры отжига на 1 шаг выше, чем температуры с наибольшей эффективностью ПЦР (величина флуоресценции при максимальном разделении сигналов). Данный выбор был обусловлен повышением специфичности реакции (отсутствие положительных сигналов ≤3 в отрицательном контроле).

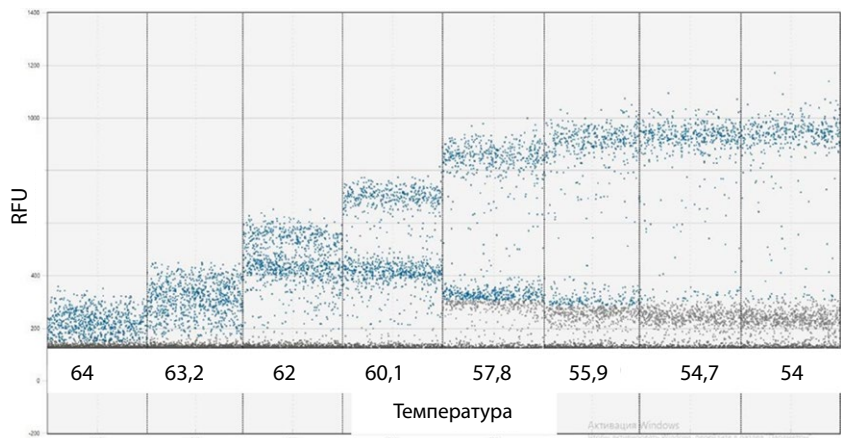


Рис. 1. Результаты градиентной цкПЦР KRAS G12C
Fig. 1. Results of gradient ddPCR for KRAS G12C

Оптимальные температуры отжига олигонуклеотидов, специфичных к мутантной аллели, составили: BRAF V600E – 58 °С, EGFR L858R – 60 °С, KRAS G12C – 58 °С. Данные условия также были использованы при амплификации соответствующих аллелей дикого типа.

Концентрация олигонуклеотидов и зондов для ПЦР

Руководствуясь рекомендуемыми параметрами цкПЦР, установленными производителем (Bio-Rad, США), была изучена эффективность и специфичность реакции при использовании следующих концентраций олигонуклеотидов: 100 nM, 150 nM, 200 nM и 250 nM. Зонды для детекции варианта KRAS G12C использовались в концентрациях – 250 nM, 500 nM и 750 nM. Примеры результатов цкПЦР с различной концентрацией олигонуклеотидов представлены на рис. 2.

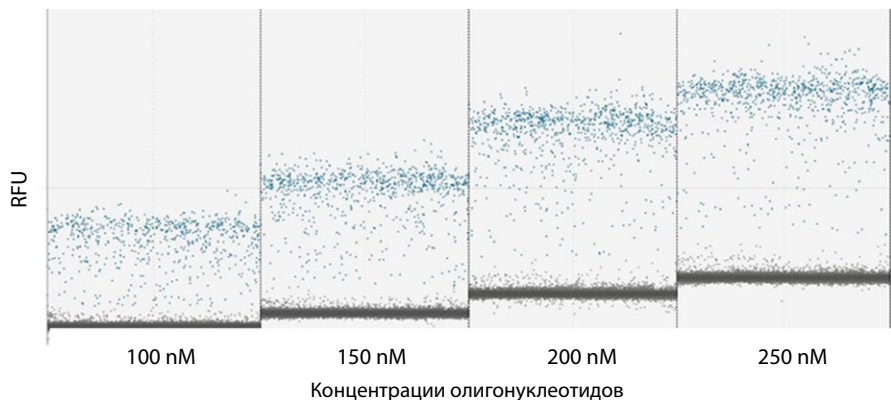


Рис. 2. Результаты цкПЦР EGFR L858R с различной концентрацией олигонуклеотидов
Fig. 2. Results of ddPCR for EGFR L858R with varying concentrations of oligonucleotides



Для дальнейшей отработки малоинвазивных методов было решено использовать концентрации олигонуклеотидов на 1 шаг ниже, чем концентрации с наибольшей эффективностью ПЦР (величина флуоресценции при максимальном разделении сигналов). Данный выбор так же, как и в случае с температурой отжига праймеров, был обусловлен повышением специфичности реакции (отсутствие положительных сигналов ≤ 3 в отрицательном контроле).

Оптимальные концентрации олигонуклеотидов в цкПЦР, специфичных к мутантной аллели, составили: BRAF V600E – 150 nM, EGFR L858R – 200 nM, KRAS G12C – 250 nM/зонды 500 nM. Данные условия также были использованы при амплификации соответствующих аллелей дикого типа.

Концентрация ДНК

Согласно руководству пользователя цкПЦР QX200/600 (Bio-Rad, США) по детекции генетических нарушений с низкой аллельной нагрузкой, стартовая концентрация ДНК определяет минимальный возможный, установленный производителем порог аналитической чувствительности (АЧ) реакции.

Для проверки эффективности и специфичности реакции были выбраны следующие стартовые количества ДНК для амплификации: 1 нг (1% АЧ) и 10 нг (0,1% АЧ).

Реакции проводили с использованием образцов ДНК с наличием исследуемых генетических нарушений и без. Пример результатов цкПЦР с различной концентрацией стартовой ДНК представлен на рис. 3.

Основываясь на специфичности реакции (отсутствие положительных сигналов ≤ 3 в образцах без мутации), оптимальные стартовые концентрации ДНК и соответствующие показатели АЧ составили: BRAF V600E – 10 нг (0,1% АЧ), EGFR L858R – 10 нг (0,1% АЧ), KRAS G12C – 1 нг (1% АЧ).

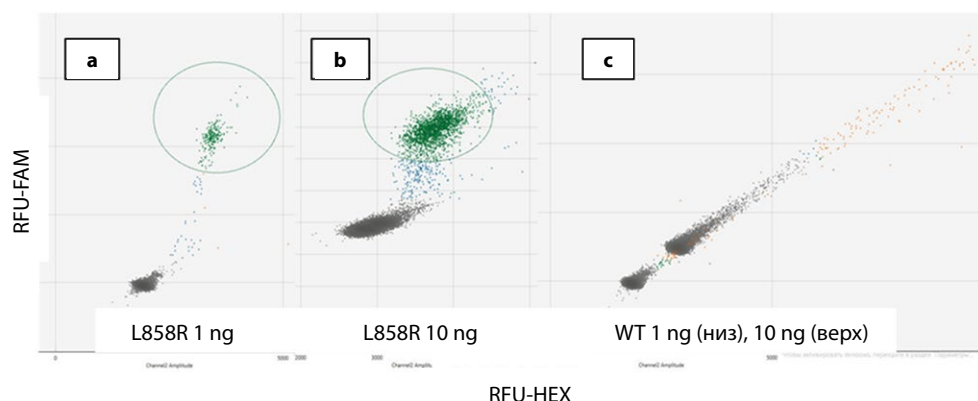


Рис. 3. Результаты цкПЦР EGFR L858R с олигонуклеотидами, специфичными к мутантной аллели, и различным стартовым количеством ДНК для амплификации, для образцов с наличием мутации (a, b) и без (c)

Fig. 3. Results of EGFR L858R ddPCR with mutation-specific oligonucleotides and varying initial DNA concentrations for samples with (a, b) and without (c) the mutation

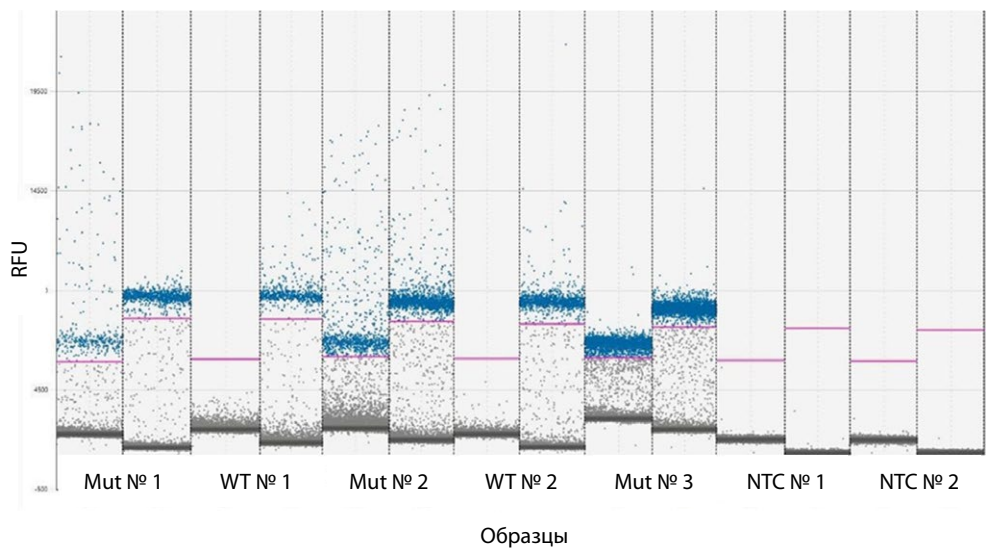


Рис. 4. Валидация результатов классической ПЦР с помощью цкПЦР для варианта EGFR L858R
Fig. 4. Validation of classical PCR results using ddPCR for the EGFR L858R variant

Валидация результатов
На следующем этапе была проведена валидация результатов классической ПЦР с использованием условий цкПЦР, установленных ранее. Для тестирования каждого маркера использовали по 3 образца биологического материала с наличием исследуемого патогенного варианта и по 2 образца без данного генетического нарушения.

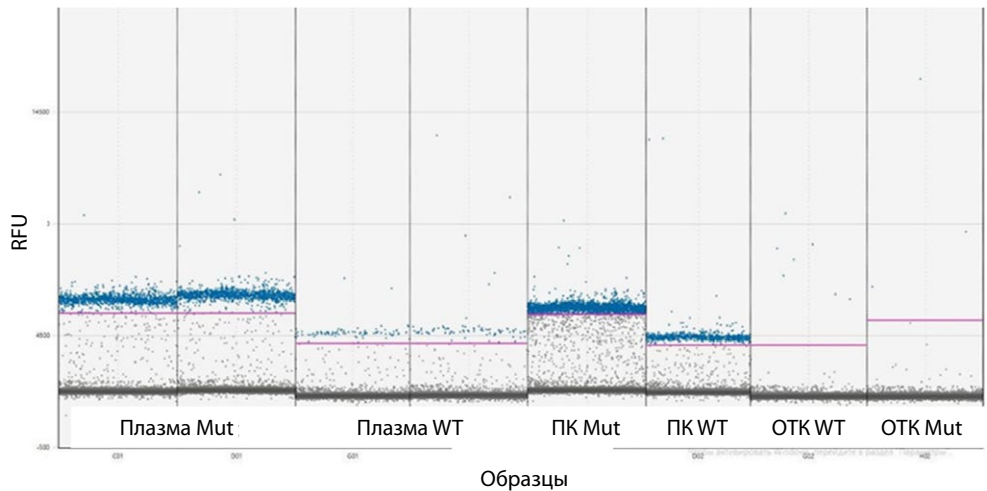


Рис. 5. Детекция варианта BRAF V600E в плазме крови пациента с аденокарциномой легкого (ПК – положительный контроль, ОТК – отрицательный контроль)
Fig. 5. Detection of the BRAF V600E variant in the plasma of a patient with lung adenocarcinoma (PC – positive control, NTC – negative control)

Также каждая постановка включала отрицательный контроль в дублях (вода). Пример результатов цкПЦР EGFR L858R представлен на рис. 4.

Детекция цодНК

Разработанные методы были применены для детекции цодНК в плазме крови пациентов с аденокарциномой легкого. Использовались образцы плазмы, полученные от пациентов с 4-й стадией заболевания и наличием в опухолевой ткани исследуемых генетических нарушений; по 1 образцу для каждого варианта. Пример результатов цкПЦР BRAF V600E для цодНК представлен на рис. 5.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны методы детекции ключевых генетических нарушений при аденокарциноме легкого на основе использования технологии цифровой капельной ПЦР, обладающие высокой аналитической чувствительностью, что позволяет использовать их для выявления цодНК.

Применение кастомных олигонуклеотидов и зондов позволяет снизить стоимость выполнения исследований на оборудовании QX600 (Bio-Rad, США). В случае варианта KRAS G12C также стоит отметить, что особенности технологии цифровой капельной ПЦР позволяют проводить аллельную дискриминацию вариантов без использования LNA-блокаторов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I. et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer*. 2018;103:356–387. doi: 10.1016/j.ejca.2018.07.005
2. Liam C.K., Mallawathanri S., Fong K.M. Is tissue still the issue in detectin molecular alterations in lung cancer? *Respirology*. 2020;25 (9):933–943. doi: 10.1111/resp.13823
3. Pisapia P., Malapelle U., Troncone G. Liquid Biopsy and Lung Cancer. *Acta cytologica*. 2019;63(6):489–496. doi: 10.1159/000492710
4. Alix-Panabières C., Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer discovery*. 2021;11(4):858–873. doi: 10.1158/2159-8290
5. Best M.G., Wesseling P., Wurdinger T. Tumor-Educated Platelets as a Noninvasive Biomarker Source for Cancer Detection and Progression Monitoring. *Cancer research*. 2018;78(13):3407–3412. doi: 10.1158/0008-5472
6. Nuzzo P.V., Berchuck J.E., Korthauer K. et al. Detection of renal cell carcinoma using plasma and urine cell-free DNA methylomes. *Nature medicine*. 2020;26(7):1041–1043. doi: 10.1038/s41591-020-0933-1
7. Shields M.D., Chen K., Dutcher G. et al. Making the Rounds: Exploring the Role of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(16):9006. doi: 10.3390/ijms23169006
8. Rolfo C., Mack P., Scagliotti G. et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *Journal of Thoracic oncology*. 2021;16(10):1647–1662. doi: 10.1016/j.jtho.2021.06.017
9. Non-small cell lung cancer. NCCN guidelines. v7.2025. Available at: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
10. Leigh N.B., Page, R.D., Raymond V.M. et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research*. 2019;25(15):4691–4700. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-0624
11. Droplet digital PCR. Bio-Rad. 2025. Available at: <https://www.bio-rad.com/en-pl/life-science/droplet-digital-pcr>
12. Digital PCR. Qiagen. 2025. Available at: <https://www.bio-rad.com/en-pl/life-science/droplet-digital-pcr>



Авдонина М.А.^{1,2}✉, Куклина Н.Г.^{1,2}, Шипулин Г.А.¹

¹ Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт медицины труда имени академика Н.Ф. Измерова, Москва, Россия

Сравнительный анализ методов экстракции РНК из образцов периферической крови

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Авдонина М.А. – написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи, сбор материала; Куклина Н.Г. – планирование исследования, обзор публикаций по теме статьи; Шипулин Г.А. – редактирование статьи, окончательное утверждение рукописи. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE.

Подана: 22.05.2025

Принята: 16.10.2025

Контакты: MAvdonina@cspmrz.ru

Резюме

Введение. Периферическая кровь активно используется в качестве биологического образца для изучения уровня экспрессии РНК различных генов. Экстракция РНК является ключевым этапом молекулярно-генетического анализа. Для ее проведения в лабораториях применяются различные методы.

Цель. Проведение сравнительного анализа различных методов выделения РНК из образцов периферической крови, а также проведение оценки качества экстрагированной РНК.

Материалы и методы. В качестве образцов были использованы 50 проб периферической крови здоровых доноров. Для сравнительного анализа были использованы четыре коммерческих набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот. Концентрацию и чистоту выделенной РНК измеряли на спектрофотометре (Blue-Ray Biotech, США) и флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Scientific, США). Оценку эффективности выделения РНК проводили методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Разработанные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, а также оригинальные реагенты были производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 4.5.0 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В ходе проведенных экспериментов были проанализированы: концентрация выделенной РНК спектрофотометрическим и флуориметрическим методами, спектральные характеристики A260/280 и A260/230, а также эффективность выделения РНК. В ходе проведенного исследования нами была произведена оценка временных ресурсов, необходимых для подготовки тридцати образцов, а также проанализированы число этапов выделения и практическая применимость разработанного протокола. Все четыре набора для выделения РНК обеспечили получение РНК с соотношением A260/A280, близким к 2,0, что свидетельствует о высокой чистоте РНК, показатель A260/230 у выделенной РНК для всех наборов реагентов оказался



значительно ниже 2,0. Наивысшие значения C_t были зарегистрированы для РНК, извлеченной с использованием фенол-хлороформной экстракции, при этом средние значения C_t для РНК, выделенной методом преципитации, оказались незначительно ниже. Статистически достоверных различий между проанализированными наборами для выделения не выявлено.

Заключение. Согласно полученным результатам отсутствуют значимые различия в анализируемых показателях, полученных с использованием апробированных методов экстракции, что позволяет использовать их на равных в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: РНК, методы экстракции РНК, периферическая кровь, молекулярно-генетические исследования, набор реагентов

Avdonina M.^{1,2}✉, Kuklina N.^{1,2}, Shipulin G.¹

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks,
Moscow, Russia

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, Russia

Comparative Analysis of Methods for RNA Extraction from Peripheral Blood Samples

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: text writing, review of publications on the topic of the article, material collecting – Avdonina M.; study design, review of publications on the topic of the article – Kuklina N.; editing, final approval of the manuscript – Shipulin G. All authors confirm that their authorship complies with the ICMJE criteria.

Submitted: 22.05.2025

Accepted: 16.10.2025

Contacts: MAvdonina@cspmz.ru

Abstract

Introduction. Peripheral blood is widely used as a biological sample for studying the RNA expression levels in various genes. RNA extraction is a key step in molecular genetic analysis. In order to perform it, various methods are used in laboratories.

Purpose. To conduct a comparative analysis of various methods for isolating RNA from peripheral blood samples and to assess the quality of the extracted RNA.

Materials and methods. Fifty peripheral blood samples from healthy donors were used. Four commercial nucleic acid extraction reagent kits were used for the comparative analysis. The concentration and purity of the isolated RNA were measured using a spectrophotometer (Blue-Ray Biotech, USA) and a Qubit 4.0 fluorimeter (Thermo Scientific, USA). The efficiency of RNA extraction was assessed using real-time RT-PCR. The designed primers and fluorescently labeled probes, as well as the original reagents, were manufactured by the Center for Surgical and Biomedical Research of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. Statistical analysis was performed using StatTech v. 4.5.0 (developed by StatTech LLC, Russia). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. In the course of experiments performed, the concentration of isolated RNA using spectrophotometric and fluorimetric methods, the spectral characteristics of A260/280 and

A260/230, and the efficiency of RNA extraction were analyzed. In this study, we estimated the time required to prepare 30 samples, analyzed the number of extraction steps, and assessed the practical applicability of the established protocol. All four RNA extraction kits yielded RNA with an A260/A280 ratio close to 2.0, indicating high RNA purity. The A260/230 ratio for the isolated RNA was significantly lower than 2.0 for all reagent kits. The highest Ct values were recorded for RNA extracted using phenol-chloroform extraction, while the average Ct values for RNA isolated using precipitation were slightly lower. No statistically significant differences were found between the analyzed extraction kits.

Conclusion. The results show no significant differences in the analyzed parameters obtained using the validated extraction methods, allowing them to be used equally in laboratory diagnostics.

Keywords: RNA, RNA extraction methods, peripheral blood, molecular genetic research, reagent kit

■ ВВЕДЕНИЕ

Периферическая кровь достаточно широко используется в качестве биологического материала при исследовании уровня экспрессии РНК различных генов как при первоначальной постановке диагноза, так и при мониторинге эффективности терапевтического лечения [1–3].

РНК является сложной макромолекулой, наиболее склонной к деградации вследствие высокой чувствительности к различным эндогенным и экзогенным РНКазам, разрушающим молекулу, что приводит к изменению профилей экспрессии генов, возможной потере редких транскриптов практически сразу после забора материала и, как следствие, может привести к ложноотрицательным результатам при проведении исследования [4].

Сохранение целостности и высокого качества выделенной РНК имеет большое значение не только при первоначальной постановке диагноза, но и при анализе мониторинга эффективности лечения (например, при выявлении минимальной остаточной болезни при хроническом миелолейкозе), поэтому для минимизации потерь рекомендуется проводить экстракцию РНК сразу после забора крови [5–7].

Различные компоненты крови (гемоглобин, холестерин), процедура взятия крови, различные условия хранения проб могут сильно влиять на качество и целостность выделяемой РНК [8, 9]. Помимо перечисленных факторов, существенное значение имеют методы экстракции из периферической крови: так, возможное присутствие дополнительных интерферирующих веществ (белки, соли, органические соединения) может значительно исказить полученные результаты [10, 11].

С целью сохранности РНК в образцах периферической крови широкое распространение получили различные системы сбора, транспортирования, хранения и стабилизации РНК, такие как PAXgene Blood RNA Tube, QIAGEN, США, Tempus™ Blood RNA Tube, Thermo FS, США, GBM RNA-X, «Градбиомед», Россия, и другие, которые, несмотря на различия в своем составе, содержат специальные реагенты для лизирования клеток крови, ингибирования РНКаз, а также химические вещества для сохранения и стабилизации РНК [5]. Многочисленные исследования по сравнению различных



протоколов выделения РНК из периферической крови (как замороженной, так и свежей) с использованием различных систем для стабилизации РНК и без них подтверждают, что применение стабилизирующих реагентов гарантирует сохранность РНК [12, 13].

Экстракция РНК – один из важных этапов молекулярно-генетического анализа. В лабораториях используют несколько методов экстракции РНК – фенол-хлороформный метод, экстракция с использованием колонок, преципитация, экстракция с использованием магнитной силики. При этом все протоколы выделения имеют общие шаги при проведении анализа: лизис клеток и ядра, денатурация различных белковых комплексов, отделение нуклеиновых кислот от клеточных остатков и очистка и концентрирование нуклеиновых кислот [14].

Экстракция по фенол-хлороформному методу предполагает смешивание образца с фенолом, хлороформом и изоамиловым спиртом в соотношениях 25 : 24 : 1 и центрифугирование.

Экстракция на спин-колонках – метод экстракции на частичках силики, был предложен еще в 1979 году: в определенных условиях РНК связывается с силикатами, что позволяет отделить все остальные компоненты клетки от частиц силики со связанной РНК [15]. Конструкция спин-колонки предполагает, что при нанесении клеточного лизата на колонку и последующем центрифугировании РНК остается на колонке, а все лишнее проходит сквозь нее.

Метод преципитации, основанный на осаждении с использованием спирта, заключается в агрегации РНК в присутствии соли и спирта. После осаждения нуклеиновая кислота (НК) отделяется от раствора с помощью центрифугирования. Осадок, содержащий целевую НК, многократно промывается спиртами и концентрируется посредством центрифугирования. На заключительном этапе РНК растворяется в водном буфере, обычно с нагреванием до 65 °С для улучшения растворимости осадка, за которым следует центрифугирование [16].

Экстракция нуклеиновых кислот на магнитных частицах осуществляется за счет смешивания образца с компонентом, нанесенным на магнитные частицы. Затем с помощью магнитного штатива отделяют магнитную фазу, содержащую присоединенную ДНК, после чего проводят промывку и элюирование нуклеиновых кислот.

Каждый из перечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки.

На данный момент нами не было найдено работ отечественных авторов, посвященных сравнению методов выделения РНК из крови (только из растений [17]).

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение сравнительного анализа различных методов выделения РНК из образцов периферической крови, а также проведение оценки качества экстрагированной РНК.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе было использовано 50 образцов периферической крови, полученных методом флеботомии практически здоровых лиц – сотрудников ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Все они дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Для сравнительного анализа нами были использованы следующие коммерческие наборы для выделения нуклеиновых кислот: «РИБО-преп» (РУ № РЗН 2020-12985

от 22 декабря 2020 г., ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), «РИБО-золь-D» (РУ № ФСР 2007/00579 от 27 февраля 2019 г., ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия), QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Германия), «Магно-Прайм Юни» (РУ № РЗН 2019_8955 от 24.09.2019, ООО «НекстБио», Россия).

С целью исключения деградации РНК в процессе забора крови и выделения РНК, которая существенно может повлиять на результаты исследования, вся периферическая кровь была помещена в транспортную среду для хранения и стабилизации РНК, в составе которой находится тетрадецилтриметиламмоний, забуференный винной кислотой [18].

Пробоподготовка осуществлялась следующим образом: 800 мкл периферической крови аликвотировали в 1,5 мл пробирки Эппендорфа со средой для стабилизации РНК в объеме 2,2 мл, после чего пробирки оставались при комнатной температуре в течение двух часов, затем их центрифугировали при 5000 g в течение 10 минут; супернатант удаляли с помощью вакуумного отсасывателя (Армед 7А-23D, Россия), добавляли 1 мл деионизованной воды и ресуспендировали с помощью дозатора до однородной суспензии. Получившуюся смесь центрифугировали 10 минут при 5000 g, удаляли супернатант, не затрагивая осадок. К осадку добавляли 100 мкл деионизованной воды, ресуспендировали с помощью дозатора и затем приступали к протоколу выделения согласно инструкциям к наборам реагентов для выделения. РНК элюировали в 50 мкл буфера для элюирования. Экстракция РНК проводилась в трех повторах каждого образца.

Определение концентрации и чистоты РНК проводили на спектрофотометре EzDrop 1000 (Blue-Ray Biotech, Тайвань) и флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Scientific, США). Каждый образец измеряли трижды. Измерения проводили при комнатной температуре.

Для оценки эффективности выделения РНК использовали метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Праймеры и зонды были подобраны на ген домашнего хозяйства ABL1 с использованием программы OligoAnalyzer™, синтезировались в АО «ГенТерра» (Россия). Смесь для ОТ-ПЦР содержала смесь олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда – 1 мкл, 5x ПЦР-буфер – 5 мкл, 10mM dNTP – 0,5 мкл, Taq-полимераза (0,5 мкл), ревертаза MMLV (0,25 мкл) (производство ФГБУ «ЦСП» ФМБА России). Реакцию амплификации проводили с помощью амплификатора ДТпрайм 96 (АО «ДНК-Технология», Россия) согласно следующей программе: обратная транскрипция при 50 °C (30 мин.), предварительный прогрев 95 °C (15 мин.), далее 45 циклов: денатурация 95 °C (10 сек.) и отжиг при 60 °C в течение 60 сек. Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась по каналу HEX. Оценку полученных результатов проводили только при правильном прохождении отрицательного и положительного контролей. В качестве отрицательного контроля была использована деионизованная вода, в качестве положительного контроля – бактериофаг MS2 с искусственно синтезированной вставкой.

Каждый образец ставили в трех повторах, после чего высчитывали среднее значение Ct и определяли стандартное отклонение с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 4.5.0 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.



■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнительном анализе методов выделения РНК учитывалось несколько критериев: эффективность экстракции РНК, концентрация и чистота РНК, простота (удобство) и продолжительность протокола выделения. Нами была проведена оценка четырех методов экстракции с помощью ряда коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот согласно инструкции производителя:

1. Комплект реагентов «РИБО-золь-D», предназначенный для этапа выделения тотальной РНК из клеток периферической крови (по методу Хомчинского) с использованием преципитирующей методики для дальнейшего анализа методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции.
2. Комплект реагентов «РИБО-преп», позволяющий реализовать метод спиртового осаждения нуклеиновых кислот с использованием гуанидина изотиоцианата в качестве хаотропного агента в лизирующем буфере.
3. Комплект реагентов «Магно-Прайм Юни»: основанный на его применении метод состоит в разрушении клеточных мембран образца с последующим связыванием с магнитным сорбентом и элюированием в буферный раствор.
4. Набор QIAamp RNA Blood Mini Kit, позволяющий быстро очистить высококачественную РНК из клеток с помощью колонок RNeasy Mini Spin с мембранами из диоксида кремния.

В результате проведенных экспериментов были получены следующие данные – значения C_t , концентрация выделенной РНК, оцененная двумя различными способами – спектрофотометрически и флуориметрически, значения спектральных характеристик $A_{260}/280$ и $A_{260}/230$.

В ходе работы нами также была проведена оценка временных затрат на выделение 30 образцов, количества этапов выделения и простоты использования протокола.

Полученные результаты представлены в таблице.

Судя по средним значениям, концентрации РНК, полученные с помощью флуориметра Qubit 4.0 при использовании различных наборов реагентов, были следующими: наилучшие результаты показал «РИБО-Золь-D» – $85,99 \pm 8,48$ мкг/л (ДИ 69,36–102,62), затем «РИБО-преп» – $52,68 \pm 2,57$ мкг/л (ДИ 47,64–57,73), «Магно-Прайм Юни» – $12,62 \pm 0,93$ мкг/л (ДИ 10,76–14,44), QIAamp RNA Blood Mini Kit – $27,84 \pm 0,45$ мкг/л (ДИ 27,00–28,77).

Результаты концентрации РНК, полученные при измерении на спектрофотометре EzDrop, незначительно отличались от полученных флуориметрическим методом лишь при использовании набора «РИБО-золь-D» – $89,97 \pm 20,15$ мкг/л (ДИ 52,16–127,79). Остальные наборы реагентов показали достаточную разницу между показателями: «РИБО-преп» – $87,01 \pm 10,30$ мкг/л (ДИ 67,69–106,34), «Магно-Прайм Юни» – $56,08 \pm 5,53$ мкг/л (ДИ 35,41–62,06), QIAamp RNA Blood Mini Kit – $56,08 \pm 1,9$ мкг/л (ДИ 35,41–62,06).

Полученная разница показателей говорит о более высокой чувствительности и избирательности флуориметрического метода измерения концентрации РНК, так как используемые наборы реагентов для измерения позволяют отдельно анализировать концентрацию РНК и ДНК в одном образце в отличие от спектрофотометрического метода [19].

Сравнение наборов реагентов для выделения РНК
Comparison of RNA Isolation Reagent Kits

Параметры сравнения	«РИБО-преп»	«Магно-Прайм Юни»	«РИБО-золь-Д»	QIAamp RNA Blood Mini Kit
Концентрация, флуориметрия (среднее значение, мкг/л)	52,68±2,57	12,62±0,93	85,99±8,48	27,84±0,45
Концентрация РНК, спектрофотометрия (среднее значение, мкг/л)	87,01±10,30	56,99±5,53	89,97±20,15	56,08±1,9
Спектральные характеристики A260/280 (среднее значение)	1,85±0,07	1,74±0,34	1,9±0,1	1,81±0,17
Спектральные характеристики A260/230 (среднее значение)	0,62±0,13	0,62±0,07	0,66±0,2	0,13±0,01
Среднее Ct со стандартным отклонением	28,00±1,85	29,9±2,09	27,12±2,18	30,16±1,77
Продолжительность выделения из расчета на 30 образцов, мин.	55	55	160	50

Примечание: таблица составлена авторами по собственным данным.

Спектрофотометрические способы оценки соотношения оптических плотностей при длинах волн 230, 260 и 280 нм позволяют судить о количестве примесей, но не о степени деградации нуклеиновых кислот. Загрязнение органическими соединениями, белками и солями было оценено с помощью коэффициентов поглощения волн A260/280 и A260/230 с использованием спектрофотометрического анализа [20].

Все четыре набора для выделения РНК позволили получить РНК с соотношением A260 нм / A280 нм, близким к 2,0, что указывает на чистоту РНК. При этом показатель A260/230 у выделенной РНК с использованием всех наборов реагентов был значительно ниже 2,0, что говорит о возможно плохой отмывке ЭДТА, присутствии ДНК или других возможных интерферирующих веществ.

Анализ экспрессии гена домашнего хозяйства ABL1 был проведен с помощью ОТ-ПЦР РВ. Полученные результаты представлены в виде средних значений пороговых циклов Ct со стандартным отклонением (см. таблицу). Наиболее высокими оказались значения Ct для РНК, выделенной методом фенол-хлороформной экстракции (набор «РИБО-золь-Д»), 27,12±2,18 (ДИ 26,35–27,91), на 0,88 цикла отстают средние значения Ct РНК, выделенной методом преципитации («РИБО-преп») – 28,00±1,85 (ДИ 27,34–28,67). Одинаковые средние значения Ct показала РНК, выделенная на спин-колонках (QIAamp RNA Blood Mini Kit) – 30,16±1,77 (ДИ 29,15–30,65), и РНК, экстрагированная с помощью магнитных частиц («Магно-Прайм Юни») – 29,9±2,09 (ДИ 29,53–30,79).

Применение t-критерия Стьюдента в анализе данных составило более 0,05 для всех исследуемых показателей, что свидетельствует о статистической недостоверности различий между проанализированными наборами для выделения.

Анализ временных затрат на экстракцию 30 образцов показал, что методы выделения на спин-колонках с использованием магнитных частиц и преципитации



наиболее быстрые (50 и 55 минут соответственно), самый долгий – метод фенол-хлороформной экстракции (160 минут), так как протокол его выполнения включает несколько длительных инкубационных этапов.

Меньше всего времени требовалось для экстракции нуклеиновых кислот с помощью набора QIAamp RNA Blood Mini Kit, на 5 минут дольше проходило выделение наборами «РИБО-преп» и «Магно-Прайм Юни», наиболее времязатратным оказался набор «РИБО-золь-Д».

При работе с наборами не требовались дополнительные реагенты, а сам ход исследования не вызывал затруднений. В то же время при использовании набора «РИБО-золь-Д» возникали определенные неудобства, связанные с большим количеством реактивов, которые хранятся в транспортных упаковках с различными условиями хранения. Что касается стоимости анализа, то наиболее дешевым оказалось выделение нуклеиновых кислот с помощью наборов отечественных производителей.

Согласно данным, полученным S. Dalkiliq, наибольший выход РНК оказался при использовании колоночного метода, а именно – набора GeneJet (18,33±4,48 мкг/л), выход РНК при использовании набора GENE Zol (фенол-хлороформная экстракция) – 15,32±3,51 мкг/л [21]. Исследование Jin-Hee Kim и др. (2014) показало, что наиболее высокие концентрации РНК, оцененные спектрофотометрическим методом, были получены с использованием реагента TRI (фенол-хлороформная экстракция), несмотря на то что средние соотношения A260/230 были ниже таковых, чем у остальных наборов реагентов (PAXgene Blood RNA и NucleoSpin RNA Blood), использующих спин-колонки. Значения Ct генов домашнего хозяйства после экстракции с помощью реагента TRI были примерно в 1,7–3,8 раза выше, чем полученные с помощью PAXgene и NucleoSpin. Наборы PAXgene и NucleoSpin дали схожие результаты с точки зрения чистоты и целостности РНК и последующей амплификации генов. Однако выход РНК с помощью NucleoSpin был в 2,9 раза выше по сравнению с PAXgene [22].

Rodríguez A. и др. (2020 г.) оценивали различные процедуры выделения РНК из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью 3 различных наборов для выделения – easyMAG, RNeasy (Mini Kit) и RiboPure (RNA Purification Kit-blood). В результате было выявлено, что наиболее эффективным является набор RiboPure, основанный на экстракции фенолом-хлороформом. Эти данные согласуются с полученными нами результатами – более высококачественная РНК получается при использовании фенол-хлороформной экстракции и метода преципитации, в отличие от применения магнитных частиц [23].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение высококачественной РНК из образцов периферической крови позволяет проводить анализ маркеров различных заболеваний на основе экспрессии генов, а также выявлять эффективность проводимого лечения. РНК – достаточно нестабильная молекула, которая способна быстро деградировать в силу различных факторов. Эффективное выделение РНК имеет важное значение для получения достоверных результатов при постановке диагноза.

Нами был проведен анализ сравнения различных методов выделения РНК из периферической крови, основанный на различных качественных и количественных характеристиках полученного препарата НК. В ходе исследования установлено,

что все четыре использованных метода экстракции показали высокую степень согласованности результатов, удовлетворяя необходимым критериям для последующего молекулярно-генетического анализа. Незначительные расхождения в полученных показателях объясняются различиями в характеристиках использованных наборов реагентов. Эти различия не оказывают существенного влияния на результаты и не препятствуют применению данных методов в лабораторной практике, что подтверждается опытом других специалистов в области лабораторной диагностики. Таким образом, все примененные методы экстракции могут быть признаны пригодными для дальнейшего использования в молекулярно-генетических исследованиях.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Skogholt A.H., Ryeng E., Erlandsen S.E., et al. Gene expression differences between PAXgene and Tempus blood RNA tubes are highly reproducible between independent samples and biobanks. *BMC Res Notes*. 2017;36. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2455-6>
2. Yip L., Fuhlbrigge R., Atkinson M.A., et al. Impact of blood collection and processing on peripheral blood gene expression profiling in type 1 diabetes. *BMC Genomics*. 2017;636. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3949-2>
3. Carrillo-Ávila J.A., de la Puente R., Catalina P., et al. Evaluation of RNA purification methods by using different blood stabilization tubes: identification of key features for epidemiological studies. *BMC Res Notes*. 2020;13(1):77. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-04943-4>
4. Schwochow D., Seriese L.E., Wayne R.K., et al. Efficient recovery of whole blood RNA – a comparison of commercial RNA extraction protocols for high-throughput applications in wildlife species. *BMC Biotechnol*. 2012;12:33. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-33>
5. Nguyen L.T., Pollock C.A., Saad S. Extraction of high quality and high yield RNA from frozen EDTA blood. *Sci Rep*. 2024;14:8628. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58576-9>
6. Prezeau N., Silvy M., Gabert J., et al. Assessment of a new RNA stabilizing reagent (Tempus Blood RNA) for minimal residual disease in onco-hematology using the EAC protocol. *Leukemia Research*. 2006;30(5):569–574. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.08.027>
7. Botling J., Edlund K., Segersten U., et al. Impact of Thawing on RNA Integrity and Gene Expression Analysis in Fresh Frozen Tissue. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2009;18(1):44–52. Available at: <https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3181857e92>
8. Meyer A., Paroni F., Günther K., et al. Evaluation of Existing Methods for Human Blood mRNA Isolation and Analysis for Large Studies. *PLoS One*. 2016;30;11(8):e0161778. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161778>
9. Ramos-Alonso L., Romero A.M., Polaina J., et al. Dissecting mRNA decay and translation inhibition during iron deficiency. *Curr Genet*. 2019;65:139–145. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225137>
10. Wilfinger W.W., Eghbalnia H.R., Mackey K., et al. Whole blood RNA extraction efficiency contributes to variability in RNA sequencing data sets. *PLoS One*. 2023;18(11):e0291209. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291209>
11. Nguyen L.T., Pollock C.A., Saad S. Extraction of high quality and high yield RNA from frozen EDTA blood. *Sci Rep*. 2024;14:8628. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58576-9>
12. Van der Sijde R., Li Y., Schraauwen R., et al. RNA from stabilized whole blood enables more comprehensive immune gene expression profiling compared to RNA from peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0235413. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235413>
13. Asare A.L., Kolchinsky S.A., Gao Z., et al. Differential gene expression profiles are dependent upon method of peripheral blood collection and RNA isolation. *BMC Genomics*. 2008;9:474. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-474>
14. Zhigaleva O., Ilin I., Mardany S., et al. Development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids from clinical material based on magnetic adsorption. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2023;68(10):650–657. (in Russian) Available at: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657>
15. Rae P.M.M., Barnett T.R., Babbitt D.G. Factors influencing the yield of satellite DNA in extractions from *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster* adults and embryos. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1976;432(2):154–160. Available at: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(76\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0005-2787(76)90157-X)
16. Available at: https://dna-technology.ru/sites/default/files/pcr_a5_083-4.pdf
17. Murgan O., Kazakova A., Efimova M. Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya*. Tomsk State University Journal of Biology. 2020;51:123–140. (in Russian) Available at: <https://doi.org/10.17223/19988591/51/7>
18. US6617170B2 2001-10-30 Application filed by Qiagen GmbH, Becton Dickinson and Co.
19. Available at: <https://www.thermoFisher.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/1014/Qubit-fluorometric-quantitation-vs-spectrophotometer-measurements.pdf>
20. Available at: <https://www.thermoFisher.com/ru/ru/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop.html>
21. Dalkılıç S.L., Dalkılıç K., Saleh K., et al. The Evaluation and Manipulation of Different Kits for Isolation of High-quality RNA from Frozen Blood. *Research Paper*. 2021;45:1571–1578. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40995-021-01171-8>
22. Kim J.H., Jin H.O., Park J.A., et al. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *SpringerPlus*. 2014;3:76. Available at: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-76>
23. Rodríguez A., Duyvejonck H., Van Belleghem J.D., et al. Comparison of procedures for RNA-extraction from peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*. 2020;15(2):e0229423. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229423>

<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.023>



Требка Е.Г.✉, Головатая Е.И.

Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Беларусь

Проблемы диагностики структурной патологии хромосом при проведении стандартного кариотипирования: собственные наблюдения

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация материала, написание, обработка, редактирование текста – Требка Е.Г.; редактирование текста, подготовка к печати – Головатая Е.И.

Финансирование: исследование не имело финансовой поддержки.

Благодарности: авторы выражают благодарность цитогенетикам Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя», Гомельского областного диагностического медико-генетического центра с консультацией «Брак и семья», Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Подана: 09.06.2025

Принята: 06.11.2025

Контакты: ekaterina.trebka@gmail.com

Резюме

Введение. Анализ морфологии хромосом человека в Беларуси проводится с помощью методов стандартного кариотипирования с применением рутинного и дифференциального GTG-окрашивания хромосом. На примерах практических случаев из обширного многолетнего опыта деятельности генетической лаборатории ГУ «РНПЦ «Мать и дитя» рассмотрены основные направления дифференциальной диагностики изменений морфологии хромосом. Востребованность дифференциальной диагностики обусловлена подобием интенсивности окрашивания и размеров хромосомных локусов разной локализации, а также высокой частотой и разнообразием вариантов эухроматиновых и гетерохроматиновых гетероморфизмов в популяции. Такого рода «ловушки» визуального восприятия GTG-бэндинга хромосом, наряду с ограничением разрешения светового микроскопирования, лежат в основе аналитических ошибок метода стандартного кариотипирования.

Цель. Определить основные направления дифференциальной диагностики структурных изменений хромосом при проведении стандартного кариотипирования методом GTG-окрашивания.

Материалы и методы. Стандартное кариотипирование, метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, хромосомный микроматричный анализ.

Результаты. При выявлении или подозрении на наличие морфологического изменения хромосом проводится дифференциальная диагностика в трех значимых в отношении клинической интерпретации направлениях: между вариантами гетероморфизма и аберрацией хромосом, между нормальной морфологией хромосом и аберрацией хромосом, между разными типами несбалансированных и сбалансированных аберраций хромосом.

Заключение. В ряде случаев для формирования окончательного заключения о кариотипе ограничения метода стандартного кариотипирования приводят к необходимости проведения дифференциальной диагностики между разными типами морфологических изменений хромосом с использованием комбинаций цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов, геномных технологий.

Ключевые слова: стандартное кариотипирование, кариотип, структурные перестройки хромосом, гетероморфизм хромосом, FISH

Trebka E.✉, Golovataja E.

Republican Scientific and Practical Centre "Mother and Child", Minsk, Belarus

Issues in Diagnosing Structural Chromosome Pathology Using Standard Karyotyping: Own Observations

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, material collection, analysis and interpretation, text writing, processing, editing – Trebka E.; editing, preparation for printing – Golovataja E.

Funding: the study has no sponsor support.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the cytogeneticists of the Republican Scientific and Practical Centre "Mother and Child", Gomel Regional Diagnostic Medical Genetic Center with the consultation "Marriage and Family", and the Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology.

Submitted: 09.06.2025

Accepted: 06.11.2025

Contacts: ekaterina.trebka@gmail.com

Abstract

Introduction. The analysis of human chromosome morphology in Belarus is carried out using standard karyotyping methods with routine and differential GTG staining of chromosomes. The main areas of differential diagnostics of chromosome morphology changes are considered using practical cases from the extensive long-term experience of the genetic laboratory of the State Institution "National Scientific and Practical Centre "Mother and Child". The demand for differential diagnostics is due to the similarity of staining intensity and sizes of chromosomal loci of different localization, as well as the high frequency and diversity of euchromatic and heterochromatic heteromorphisms in the population. Such "traps" of visual perception of GTG banding of chromosomes along with the limited resolution of light microscopy underlie the analytical gaps of the standard karyotyping method.

Purpose. To determine the main directions of differential diagnostics of structural changes in chromosomes during standard karyotyping using the GTG staining method.

Materials and methods. Standard karyotyping, fluorescent in situ hybridization method, and chromosome microarray analysis.

Results. When a morphological change in chromosomes is detected or suspected, differential diagnostics are performed in three directions that are significant in terms of clinical interpretation: between variants of heteromorphism and chromosome aberration, between normal chromosome morphology and chromosome aberration, and between different types of unbalanced and aberration-balanced chromosomes.

Conclusion. In a number of cases, when generating a final conclusion about the karyotype, the limitations of the standard karyotyping method necessitate differential diagnostics between different types of morphological changes in chromosomes using combinations of cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular genetic methods, genomic technologies.

Keywords: standard karyotyping, karyotype, structural chromosome rearrangements, chromosome heteromorphism, FISH

■ ВВЕДЕНИЕ

В Беларуси стандартное кариотипирование (СК) с использованием GTG-окрашивания (GTG-бэндинга) является первой линией лабораторного генетического обследования при подозрении на хромосомную патологию. Показаниями для исследования кариотипа являются состояния, при которых наблюдается высокая частота хромосомных аномалий: врожденные пороки и особенности развития, нарушения полового развития, задержка физического и умственного развития, тяжелые нарушения сперматогенеза у мужчин, спонтанные прерывания беременности в анамнезе, обнаружение у плода или ребенка структурной хромосомной патологии и др. СК дает информацию об общем количестве хромосом, численных и структурных аномалиях хромосом, эухроматиновых и гетерохроматиновых вариантах гетероморфизмов. Как правило, за исключением случаев низкоуровневого мозаицизма, определение численных аномалий хромосом не вызывает затруднений. Однако СК как метод диагностики структурных хромосомных аномалий (rea) имеет ряд ограничений, обусловленных разрешением микроскопирования (установление хромосомных изменений более 5–10 Mb) или визуальным подобием размеров и интенсивности GTG-окрашивания разных хромосомных локусов (хромосомная мимикрия). Принципиальное значение для интерпретации результатов СК имеет ряд характеристик цитогенетического исследования: методы окрашивания хромосом, разрешение хромосомного бэндинга (количество проанализированных G-позитивных и G-негативных полос в пересчете на гаплоидный геном), использование дополнительных методов диагностики, число проанализированных метафазных ядер. Указание данной информации в заключении о кариотипе должно давать ясное представление о возможностях и ограничениях проведенного анализа [1].

Подобие хромосомного GTG-бэндинга разных хромосомных локусов лежит в основе проблем интерпретации проведенного анализа кариотипа. При невозможности провести дифференциальную диагностику (ДД) между нормальным/сбалансированным и несбалансированным кариотипом или между разными типами rea на основании анализа GTG-бэндов возникает необходимость в дополнительных исследованиях. Точное установление кариотипа является критически значимым для определения дальнейшей тактики диагностики заболевания у данного пациента, оценки вероятных вариантов хромосомного набора в гаметах и прогноза в потомстве. С целью установления характера наследования выявленного изменения (родительское происхождение или *de novo*) и формирования корректного цитогенетического заключения проводится СК родителей пациента. В спорных (с точки зрения интерпретации найденных хромосомных изменений) случаях применяется комплексный подход, который включает комбинации подтверждающих и дополняющих друг друга лабораторных генетических исследований – цитогенетических, молекулярно-цитогенетических, молекулярно-генетических, геномных. Перечисленные методы отличаются друг от друга объектами анализа, уровнем разрешения, задачами исследования. Комплексный подход значительно повышает эффективность лабораторной генетической диагностики и качество оказания медицинской помощи пациенту [2].

Несмотря на стремительное внедрение и широкое использование в клинической практике для выявления хромосомных аномалий таких полногеномных методов исследований высокого разрешения, как хромосомный микроматричный анализ (ХМА)

и оптическое картирование генома (OGM), СК до сих пор считается «золотым стандартом» исследований хромосомных аномалий [1, 3]. Более того, в ряде случаев результаты высокотехнологичных методов хромосомного анализа требуют проведения СК и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с целью корректной интерпретации природы найденных патологических изменений и установления кариотипа [1–3].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить основные направления дифференциальной диагностики структурных изменений хромосом при проведении стандартного кариотипирования методом GTG-окрашивания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование кариотипа являлось основным методом анализа и проводилось с помощью стандартного кариотипирования с использованием дифференциального окрашивания хромосом (GTG-, CBG-banding). Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* применялся в качестве дополнительного с целью дифференциальной диагностики структурных аномалий хромосом. Зонды (локуспецифические, центромерные, субтеломерные) подбирались индивидуально в каждом случае. Хромосомный микроматричный анализ выполнялся в варианте SNP-array в случаях подозрения на хромосомную болезнь у пациентов с нормальным кариотипом, установленным методом стандартного кариотипирования, или для уточнения структурной перестройки хромосом.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установление морфологического изменения хромосом при проведении исследования кариотипа методом GTG-бэндинга требует анализа характера и оценки вероятных причин этого изменения, дифференциальной диагностики между нормальными вариантами гетероморфизма хромосом и *rea*, определения типа хромосомной аберрации. В ряде случаев определяющим в понимании выявленного изменения структуры хромосом является СК родителей пациента.

ДД, как правило, требует проведения дополнительных исследований либо в рамках СК с применением специфических методов окрашивания (CBG, NOR), либо с использованием других лабораторных генетических методов более высокого разрешения (FISH, молекулярно-генетические тесты, ХМА, OGM). Выбор метода обусловлен характером и локализацией измененного хромосомного района, целью исследования, используемыми в лаборатории методами. Целесообразность проведения дополнительных исследований оценивается индивидуально для каждого пациента.

Наиболее проблемными для выявления при СК являются аберрации, которые не приводят к изменению размеров и GTG-бэндинга хромосомного локуса или имитируют ХГ. Такие локусы, несмотря на размер более 5–10 Mb, доступный для визуального анализа, с большой вероятностью интерпретируются в заключении кариотипа как нормальные или в пределах нормальной вариабельности, и выявление аберраций в них возможно только на последующих этапах генетического обследования с помощью методов FISH, ХМА, OGM.

Основываясь на многолетнем практическом опыте цитогенетической работы лаборатории, можно выделить 3 значимых в отношении клинической интерпретации

направления ДД при выявлении морфологического изменения хромосом методом GTG-бэндинга: между гетероморфизмами и *rea*, между нормальной морфологией хромосом и *rea*, между разными типами *rea*. Приводим практические примеры из цитогенетической практики генетических лабораторий Республики Беларусь, иллюстрирующие необходимость применения комплексного подхода в решении проблем интерпретации хромосомного бэндинга при СК.

Дифференциальная диагностика между гетероморфизмами и структурными аномалиями хромосом

При выявлении изменения морфологии хромосом в первую очередь анализируется, характерен ли для данного хромосомного локуса хромосомный гетероморфизм (ХГ). К ХГ относят визуализируемую при микроскопировании нормальную вариабельность гетерохроматиновых и эухроматиновых локусов хромосом среди индивидуумов в популяции по размеру (что реализуется в «безвредные» цитогенетические вариации числа копий геномного материала – CG CNV по типу *del/dup*), свойствам окрашивания, локализации (расположение относительно центромеры в пределах «своей» хромосомы или транслокация локуса в другие участки генома). Районы ХГ обладают стабильностью при делении клеток и содержат в своем составе повторности сателлитной ДНК и средние повторяющиеся последовательности, включающие мобильные элементы и ретровирусы [4]. При СК наиболее часто выявляют вариабельность сателлитной ДНК – размера и локализации в геноме элементов коротких плеч (р-плеч) акроцентрических хромосом (АцХ, хромосомы 13–15 и 21–22), размера гетерохроматиновых локусов центромерных районов хромосом, размера и локализации относительно центромеры бэндов 1q12, 9q12, 16q11.2 и Yq12 (ХГ по типу инверсий) [4–6]. Несмотря на многочисленные исследования, до сих пор не получено убедительных доказательств негативного влияния ХГ на фенотип, развитие умственной отсталости и генетические синдромы [4, 5].

Мнения генетиков о целесообразности включения описания ХГ в состав записи кариотипа различаются. Согласно международной цитогеномной номенклатуре человека ISCN вследствие отсутствия патологических эффектов на фенотип присутствие ХГ не указывается в записи кариотипа пациента [1, 6]. Согласно требованиям Министерства здравоохранения Республики Беларусь в цитогенетическом заключении принято отмечать экстремальные варианты гетероморфизмов с целью экономии времени и нивелирования аналитических ошибок при проведении последующих пренатальных цитогенетических исследований и при описании семейного носительства.

Настороженность цитогенетика относительно вариантов гетероморфизмов способствует значительному снижению вероятности ошибок в заключении, когда ХГ интерпретируется как вариант нормального кариотипа вместо ошибочного заключения о несбалансированном кариотипе. Однако в то же время при выявлении изменения морфологии хромосомного локуса в характерной для ХГ локализации существует опасность оценки чужеродного патологического хромосомного материала как нормальной вариабельности. Таким образом, для интерпретации морфологии хромосомных локусов, для которых характерна высокая частота ХГ, вероятны 2 типа аналитических ошибок: интерпретация ХГ как *rea* (ложноположительная ошибка), интерпретация *rea* как варианта ХГ (ложноотрицательная ошибка). Разнообразие

морфологии и локализации ХГ в кариотипе человека приводит к необходимости устанавливать природу найденного при СК изменения – проводить дифференциальную диагностику между ХГ и патологическими абберациями.

«Нейтральные» варианты гетероморфизмов с вовлечением р-плеч АцХ vs структурная патология с носительством эухроматинового материала в районах р-плеч АцХ. Частота CG CNV р-плеч АцХ – одна из самых высоких и составляет 2,5% в общей популяции [5]. Именно вариабельность р-плеч АцХ лежит в основе цитогенетических различий между индивидами в популяции (за исключением монозиготных близнецов), а также является существенной проблемой корректной интерпретации кариотипа при «неклассической» морфологии спутника (ps) и спутничной нити (pstk) и образовании экстремальных вариантов ХГ. И наоборот, внутри- и межхромосомные реаранжировки с вовлечением эухроматиновых локусов генома по локализации и размеру могут имитировать варианты гетероморфизма р-плеч АцХ и быть неочевидными при анализе вследствие технических ограничений СК. Поэтому ДД гетероморфизмов и реаранжировок является клинически значимой. На рис. 1 представлены перестройки с вовлечением р-плеч АцХ, требующие проведения ДД.

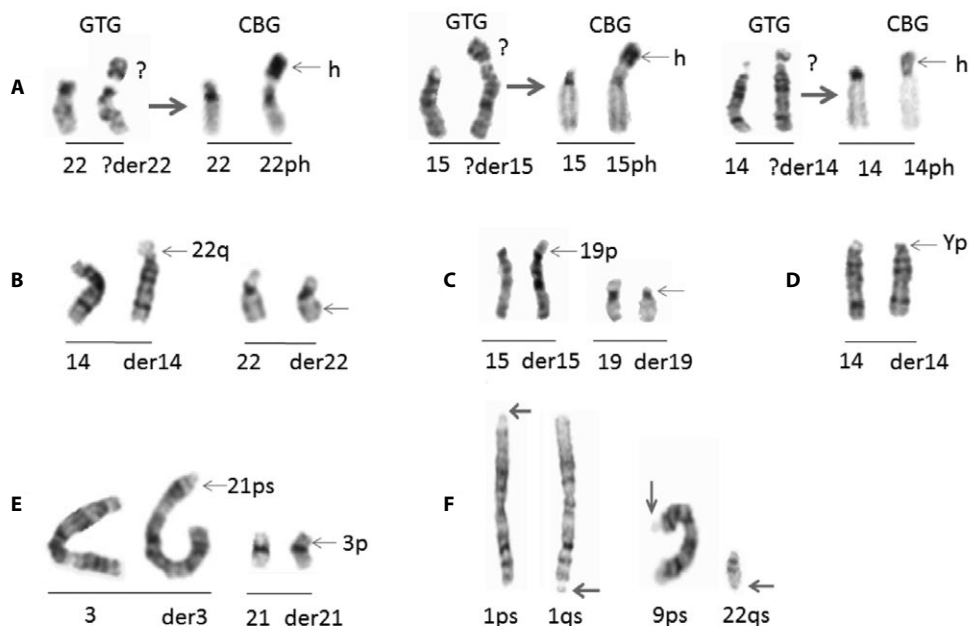


Рис. 1. Перестройки с вовлечением р-плеч акроцентрических хромосом (GTG, CBG) (фото из базы данных кариотипов пациентов РНПЦ «Мать и дитя»): А – гетерохроматинные гетероморфизмы р-плеч АцХ, окрашивание GTG, CBG: 22ph, 15ph, 14ph; В–Е – транслокации с вовлечением р-плеч АцХ, окрашивание GTG: В – t(14;22)(p11;q13); С – t(15;19)(p11.2;p11.2); D – der(14)t(Y;14)(p32;p11) (SRY+,14q32+), E – t(3;21)(p26;p11); F – вариабельность локализации р-плеч АцХ 1ps, 1qs, 9ps, 22qs
Fig. 1. Rearrangements involving the p-arms of acrocentric chromosomes (GTG, CBG) (photo from the Mother and Child patient karyotype database): A – heterochromatic heteromorphisms of the p-arms acrocentric chromosomes, GTG, CBG staining: 22ph, 15ph, 14ph; B–E – translocations involving the p-arms, GTG staining: B – t(14;22)(p11;q13); C – t(15;19)(p11.2;p11.2); D – der(14)t(Y;14)(p32;p11) (SRY+,14q32+), E – t(3;21)(p26;p11); F – variability in the localization of the p-arms 1ps, 1qs, 9ps, 22qs

Потеря классической морфологии р-плеча АцХ может быть обусловлена транслокацией (t) между р-плечом АцХ и материалом другой хромосомы. К распространенным ХГ относят р-плечи дериватных (der) АцХ с носительством гетерохроматинового блока Yq12. Как правило, варианты АцХph/der(АцХ)t(Y;АцХ)(q12;p11) встречаются как случайные находки при СК у индивидуумов обоих полов и имеют семейный характер наследования. Повышенная частота вовлечения р-плеч 15 (52%) и 22 (33%) хромосом в t отражает высокую степень гомологии их классической сателлитной ДНК в p11.2 с Yq12 [5]. Диагностировать гетерохроматиновый материал только на основании GTG-бэндинга не всегда представляется возможным в силу варибельного окрашивания конститутивного гетерохроматина при GTG-бэндинге (рис. 1А). Поскольку гетерохроматиновые районы в нетипичной локализации могут восприниматься при анализе GTG-бэндинга как добавочный эухроматиновый материал, для визуализации районов конститутивного гетерохроматина и во избежание ложноположительной ошибки о несбалансированном кариотипе пациента используются дополнительные методы окрашивания, например, CBG или FISH. Следует помнить, что размер локуса Yq12 среди мужчин в популяции является также ХГ, соответственно, при такого рода t отмечается варибельность размера р-плеча АцХ. ХГ р-плеч АцХ также может быть обусловлен CG-CNV по типу dup/trp 3 разных цитогенетических бэндов р-плеча (p11.2/12/13) и центромеры, для анализа которых используется окрашивание CBG, NOR, FISH [5].

Однако вероятно и обратная ситуация. Восприятие р-плеча АцХ как варианта ХГ при GTG-окрашивании без проведения дополнительных исследований может привести к ложноотрицательному заключению о хромосомной патологии. На рис. 1В–Е представлены t между р-плечами АцХ и эухроматиновыми локусами. Показаниями для СК в случаях t(14;22) и t(15;19) были спонтанные прерывания беременности (рис. 1В, 1С), der(14)t(Y;14) – азооспермия у мужчины (рис. 1D), t(3;21) – выявление der(3) у ребенка со множественными особенностями развития (рис. 1Е). Носительство транслоцированного эухроматинового материала в р-плечах АцХ с образованием der(14), der(15), der(21) имитирует ХГ спутничных районов. Такие t относятся к криптическим не вследствие их «невидимости» при СК, а в силу высокой вероятности оценки транслоцированного эухроматинового материала в районе р-плеча АцХ как варианта ХГ, что, в свою очередь, обусловлено высокой распространенностью и варибельностью гетероморфизмов р-плеч АцХ в популяции, «привычкой» цитогенетика не придавать клинической значимости их морфологии, редкими описаниями в литературе t эухроматинового материала в район р-плеч АцХ. Особенно проблемным является анализ кариотипа при t эухроматинового материала, соизмеримого с обычным размером спутничной нити и/или спутника АцХ и при наследовании только одной дериватной АцХ хромосомы в составе несбалансированного кариотипа.

Представленная на рис. 1D der(14)t(Y;14)(p32;p11) была установлена только после проведения FISH. Первое исследование FISH было выполнено с целью определения причины 46,XX нарушения формирования пола у пациента с мужским фенотипом и азооспермией и установления локализации пол-определяющего гена SRY. Однако наиболее частая абберрация t(X;Y) была исключена, поскольку ген SRY локализовался в районе р-плеча одной из АцХ группы D (рис. 2А). После прицельного реанализа GTG-бэндинга и последующего раунда FISH была выявлена der14 с криптической аномалией р-плеча (рис. 2В).

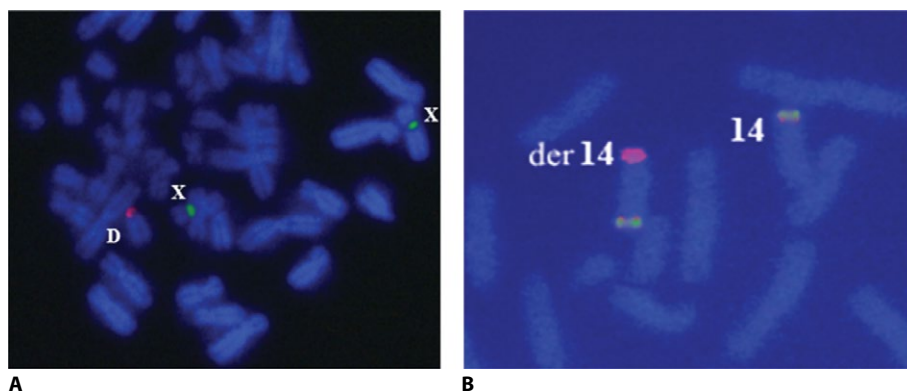


Рис. 2. Кариотип 46,XX,der(14) (SRY+,14q32+) (метафазные хромосомы, FISH): А – FISH с использованием ДНК-зондов LSI SRY Spectrum Orange/DXZ1 Spectrum Green (Abb.Mol.); В – FISH с использованием ДНК-зондов LSI SRY Spectrum Orange, LSI IGH Dual SO+SG(14q32)Color (Abb.Mol.)
Fig. 2. Karyotype 46,XX,der(14) (SRY+,14q32+) (Metaphase chromosomes, FISH): А – FISH using DNA probes LSI SRY Spectrum Orange/DXZ1 Spectrum Green (Abb.Mol.); В – FISH using DNA probes LSI SRY Spectrum Orange, LSI IGH Dual SO+SG(14q32)Color (Abb.Mol.)

Как правило, изменение числа копий р-плеча АцХ в кариотипе также принято относить к гетероморфизмам, однако локализация дополнительного материала рs АцХ в нетипичном локусе кариотипа может быть следствием потери субтеломерного эухроматина в месте присоединения рs за счет криптической t. Для примера на рис. 1Е представлена t(3;21) у женщины, которая была установлена при СК и впоследствии подтверждена с помощью метода FISH. Морфология аномального р-плеча 21-й хромосомы является примером имитации ХГ и «нормальной» с точки зрения сохранения целостности всех G-бэндов морфологии 3-й хромосомы. Таким образом, аномальный фенотип ребенка был обусловлен наследованием der3 с не визуализируемой терминальной делецией 3p. Данный случай подчеркивает золотое правило цитогенетики – важность СК родителей при выявлении измененной морфологии хромосом у плода или ребенка.

В нашей практике при СК было выявлено несколько случаев локализации спутников на неacroцентрических хромосомах у детей с врожденными пороками и особенностями развития и у взрослых с нарушениями фертильности (рис. 1F). Вероятность образования при этом неидентифицируемых при СК делеций дистальных эухроматиновых районов хромосом является веским основанием рекомендовать проведение таргетных молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических исследований при выявлении нетипичной локализации спутников р-плеч АцХ.

Локализация гетерохроматиновых районов в нетипичных хромосомных районах vs структурная патология эухроматиновых локусов. Ограничение GTG-бэндинга в выявлении гетерохроматинового материала приводит к тому, что G-позитивные и G-негативные гетерохроматиновые бэнды в нетипичной локализации, например, вследствие инверсий (inv) и транслокаций (t), могут интерпретироваться как эухроматиновые. На рис. 3 представлены случаи исследования обратившихся к нам взрослых пациентов, когда подозрение на носительство дополнительного материала гетерохроматина появилось вследствие отсутствия выраженных



аномалий фенотипа и пороков развития, характерных для несбалансированного кариотипа. Проведение CBG позволило избежать аналитических ошибок.

В первом случае у пациентки женского пола была установлена aberrация $\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$ – носительство гетерохроматинового материала в дистальном районе Xp за счет t(X;Y)(p22;q11) (рис. 3A). Данная aberrация относится к частому типу t между половыми хромосомами вследствие локализации гомологичных последовательностей (LINE) в локусах Xp22 и Yq11 (горячие точки рекомбинации) [7]. Размер визуализируемого добавочного материала относится к XГ и зависит от размера гетерохроматинового бэнда Yq12 у предшественника мужского пола, в мейозе которого произошла перестройка. У 90% женщин – носителей $46,X,\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$ отмечается низкое физическое развитие, у некоторых описаны аномалии скелета, лицевые дисморфии, пороки развития глаз и сердца [7]. Перечисленные аномалии фенотипа характерны также для синдрома Тернера, т. к. при обеих патологиях имеется моносомия дистального района Xp. Однако существенным отличием женщин с $\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$ является сохранение фертильности, что приводит к наследуемым случаям derX . У пациентов мужского пола $\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$ с нуллисомией Xp сопровождается тяжелыми пороками развития. Во втором случае выявлена вставка бэнда гетерохроматина в эухроматиновый район 1q41~42 у пациентов мужского и женского пола со спонтанными прерываниями беременности в анамнезе (рис. 3B). Визуализируемые добавочные бэнды гетерохроматина чаще всего наследуются без клинических проявлений, могут быть образованы вследствие инсерций или инверсий конститутивного гетерохроматина хромосом 1, 9, 16. Однако в случаях *de novo* нельзя исключить эффект положения генов вследствие повреждения критических генов и их окружения [5].

Исследование ХМА не является результативным в отношении установления такого типа CG CNV, состоящего из высокоповторяющихся последовательностей в составе гетерохроматинового материала (ограничение метода). Отсутствие добавочных CNV в результатах ХМА является косвенным свидетельством в пользу того, что выявленный при СК дополнительный материал является инертным в генетическом плане гетерохроматином.

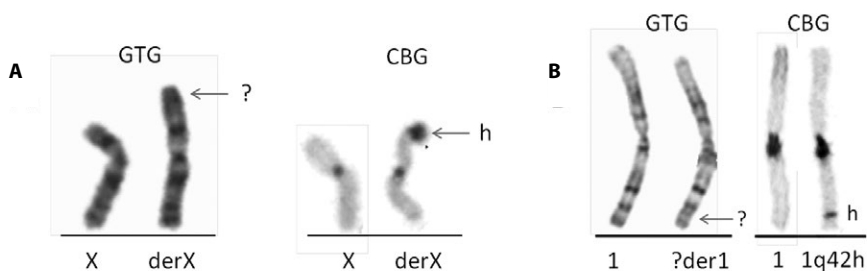


Рис. 3. Перестройки с локализацией гетерохроматина в нетипичных хромосомных локусах (GTG, CBG) (фото из базы данных кариотипов пациентов РНПЦ «Мать и дитя»):

A – несбалансированная транслокация $\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$; B – инсерция гетерохроматина 1q42h
Fig. 3. Rearrangements with localization of heterochromatin in atypical chromosomal loci (GTG, CBG) (photo from the Mother and Child patient karyotype database): A – unbalanced translocation $\text{der(X)t(X;Y)(p22;q11)}$; B – heterochromatin insertion 1q42h

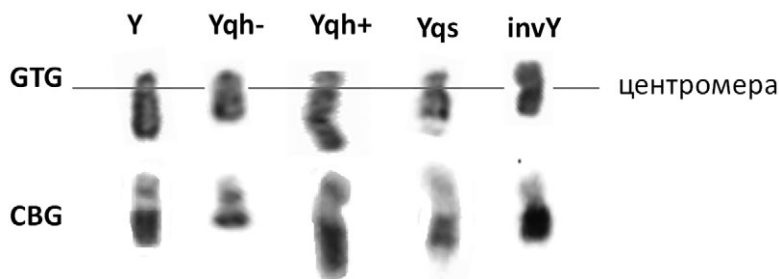


Рис. 4. Гетероморфизмы Y-хромосомы (GTG, CBG) (фото из базы данных кариотипов пациентов РНПЦ «Мать и дитя»)

Fig. 4. Y-chromosome heteromorphisms (GTG, CBG) (photo from the Mother and Child patient karyotype database)

Гетероморфизмы Y-хромосомы vs структурные аномалии Y-хромосомы reaY. Проблема ДД гетероморфизмов Y-хромосомы и reaY обусловлена особенностями морфологии Y-хромосомы при GTG-окрашивании: малыми размерами хромосомы, отсутствием сигнальных бэндов, неконтрастным окрашиванием, распространением гетероморфизмов Y-хромосомы в популяции (рис. 4).

Разработанный в нашей лаборатории алгоритм комплексной диагностики reaY с использованием СК, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов позволяет эффективно проводить ДД между гетероморфизмами и reaY и устанавливать типы reaY. При подозрении на вариант гетероморфизма или reaY (особенно у пациентов с необструктивной азооспермией, нарушениями формирования пола, нарушениями полового развития) следующим диагностическим этапом после GTG-окрашивания является проведение CBG. CBG позволяет провести первичную ДД за счет анализа числа, локализации, размера бэнда Yq12 и оценки числа и локализации центromеры. Согласно проведенному исследованию кариотипов с патологией Y-хромосомы, необходимо проводить ДД между вариантами гетероморфизма и следующими reaY: Yqh- и delYq11.2/ idic(Y)(q11.2)/i(Y)(p10)/r(Y), Y-хромосома среднего размера и idic(Y)(q11.2), Yqh+ и idic(Y)(q12), inv(Y)(p11.2q11.2) и delYq11.2/ idic(Y)(q11.2)/i(Y)(p10) [8]. Косвенными признаками reaY являются «сложенная» форма Y-хромосомы в метафазных пластинках (характерна для psuidic(Y)(q11.2)); различная морфология и число reaY в разных метафазных пластинках (динамический мозаицизм), мозаицизм с присутствием клона 45,X в кариотипе. Для определения типа rea используются методы FISH и исследование локуса фактора азооспермии AZF [8, 9].

Перицентрическая инверсия inv(Y)(p11.2q11.2) согласно ISCN относится к вариантам нормального кариотипа. В большинстве случаев аналогично другим гетероморфизмам он наследуется и не имеет клинической значимости. Однако при молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических исследованиях дифференцируется 4 типа inv(Y)(p11.2q11.2) в зависимости от локализации точек разрывов, включая критичный для сперматогенеза локус AZF [4, 10]. Поэтому при установлении inv de novo и признаках нарушения сперматогенеза у мужчины рекомендуется проведение исследований локуса AZF.

Гетероморфизмы эухроматиновых районов vs структурная патология эухроматиновых локусов. К гетероморфизмам эухроматинового материала в геноме человека относят эухроматиновые CG-CNV (эухроматиновые варианты EVs) без негативного фенотипического эффекта [5, 11]. EVs, как и варианты гетерохроматиновых районов, распространены у относительно большого числа людей в популяции, наследуются в поколениях, не имеют клинической значимости и ассоциируются с нормальным фенотипом, локализованы в G-негативных или G-позитивных бэндах разных хромосом или выявляются в виде дополнительных копий перицентромерных районов (не содержащих критичных дозозависимых генов) хромосом в составе сверхчисленных маркерных хромосом sSMC [4, 5]. Отсутствие выраженных фенотипических проявлений может быть обусловлено, например, отсутствием дозозависимых генов в районах CNV, компенсацией дозового эффекта за счет близкородственных генов в других локусах генома, гетерохроматизацией [5, 11]. EV при СК представлены в виде несбалансированных t, dup, del, кольцевых хромосом, сверхчисленных маркерных хромосом [5].

EVs по типу del/dup установлены для ряда хромосомных локусов 4p16, 8p23.1, 8q21.1, 9p12, 9q13-q21.12, 15q11.2, 16p11.2 [1, 4, 5, 11, 12]. Одной из причин образования EVs является полиморфизм генов (молекулярно-генетический MG-CNV) в виде чрезмерного увеличения их копий, что, в свою очередь, приводит к увеличению размера цитогенетического бэнда. Например, такое происхождение EVs показано для гетероморфизма в локусе 15q11.2 [5]. Выявление CG-CNV при СК требует проведения ДД между клинически благоприятным EVs и патогенной аберрацией эухроматина [1]. В отличие от гетерохроматиновых гетероморфизмов EVs не окрашиваются при CBG. Вследствие технических ограничений СК существует опасность ошибочного анализа EVs – как неблагоприятных несбалансированных rea [11]. Поэтому проводятся исследования родственников пациента, а также детальный анализ измененного цитогенетического бэнда с помощью геномных исследований XMA/OGM [1].

Более того, в литературе встречаются описания семейного носительства крупных эухроматиновых del/dup/ins/der, которые не относятся к EVs в перечисленных хромосомных локусах и также не сопровождаются выраженными клиническими эффектами – несбалансированные хромосомные аномалии без фенотипических последствий (UBCA). На практике выявление каждого случая UBCA вызывает множество гипотез, требует проведения дополнительных исследований, и, как следствие, может затруднить генетическое консультирование и определение однозначного прогноза [5].

В нашей практике был установлен случай EV в длинном плече Y-хромосомы. У пациента без аномалий фенотипа и с сохраненным сперматогенезом определен дополнительный материал в эухроматиновом районе Yq11.2 – кариотип 46,X,?dup(Y)(q11.2)pat. При последующем проведении XMA в локусе Yq11.233 была идентифицирована дупликация крайне малого для цитогенетической визуализации размера – 142,5 kb. Однако для генов этого локуса согласно базе данных геномных вариантов DGV характерен 100% полиморфизм по типу увеличения CNV, что, как мы полагаем, способствовало выявлению изменения при СК.

К ХГ эухроматинового материала относят также семейные случаи перицентрических инверсий inv(2)(p11.2q13), inv(3)(p11~13q11~12), inv(5)(p13q13), inv(10)(p11.2q21.2), которые не оказывают негативного фенотипического эффекта, включая спонтанные прерывания беременности [1, 5, 11].

Информированность врачей генетических специальностей о диагностике распространенных типов ХГ значительно сокращает длительность и интерпретацию результатов СК, оценку рисков и составление прогноза для пациентов.

Дифференциальная диагностика между нормальной морфологией хромосом и структурными аномалиями хромосом

Вследствие подобия тропности хромосомных районов разной геномной локализации к окрашиванию и, соответственно, их сходного цитогенетического GTG-рисунка геа могут быть криптическими даже при размере перестроенного локуса более 5–10 млн п. н. Такие аномалии обычно диагностируются в составе несбалансированного генома у ребенка или плода на следующих этапах лабораторной генетической диагностики, например, с использованием ХМА и FISH. К сожалению, только на основании результатов геномных исследований и выявления несбалансированного состояния генома в потомстве появляется возможность проведения прицельного поиска криптических сбалансированных перестроек у родителей с помощью FISH с целью установления корректного кариотипа и типа наследования.

Приводим случай установления геа в результате реализации комплексного цитогенетического подхода. У мальчика со множественными врожденными пороками развития при анализе GTG-бэндинга была установлена нормальная морфология всех хромосом в кариотипе. На основании клинической картины, ассоциированной с хромосомным заболеванием, было проведено исследование ХМА и установлено носительство *der18* за счет равноценной, согласно визуальной оценке при микрокопировании, по размеру и GTG-бэндингу (рис. 5А) транслокации терминального материала *Xp* (6,1 млн п. н., *arr[GRCh37]*) в область терминального локуса *18q* (7 млн п. н., *arr[GRCh37]*). Аберрация была подтверждена FISH со специфическими к *18* и *X* хромосомам ДНК-зондами. Окончательный кариотип ребенка *46,XY,ish der(18)t(X;18)(p22.31;q22.3) (D18Z1+,DXYS129+,VIJyRM2050-)dn*.

На рис. 5В представлена *t(10;12)(p14;p13.2)*, установленная у пациентки со сложным многолетним акушерским анамнезом (спонтанные прерывания и неразвивающиеся беременности, безуспешные попытки ЭКО). Транслокация не была установлена при первом СК в силу подобия бэндинга дистальных районов *10p* и *12p*, но была подтверждена с помощью FISH после обнаружения симметричных CNV – частичных *del* и *dup* одних и тех же локусов *10* и *12* хромосом – у разных плодов в ходе проведения преимплантационной диагностики.

На рис. 5С представлен другой случай из нашей практики, когда *inv(16)* имитировала нормальную морфологию 17-й хромосомы за счет смещения центромерного индекса. Пациентка в сроке 12 недель беременности была направлена на пренатальную цитогенетическую диагностику по поводу высокого риска по хромосомным болезням по результатам комбинированного скрининга I триместра беременности.

Хромосомный анализ культуры биоптата ворсин хориона (БВХ) при полупрямом методе приготовления препарата установил нормальный мужской кариотип – *46,XY*, при длительном культивировании – аномальный кариотип с трисомией 17 хромосомы *47,XY,+17* [25]. В клетках трофобласта (полупрямой метод) в связи с особенностями окрашивания невозможно точно сказать, присутствует ли измененная 16-я хромосома в кариотипе. Вследствие выявленного плацентарного мозаицизма

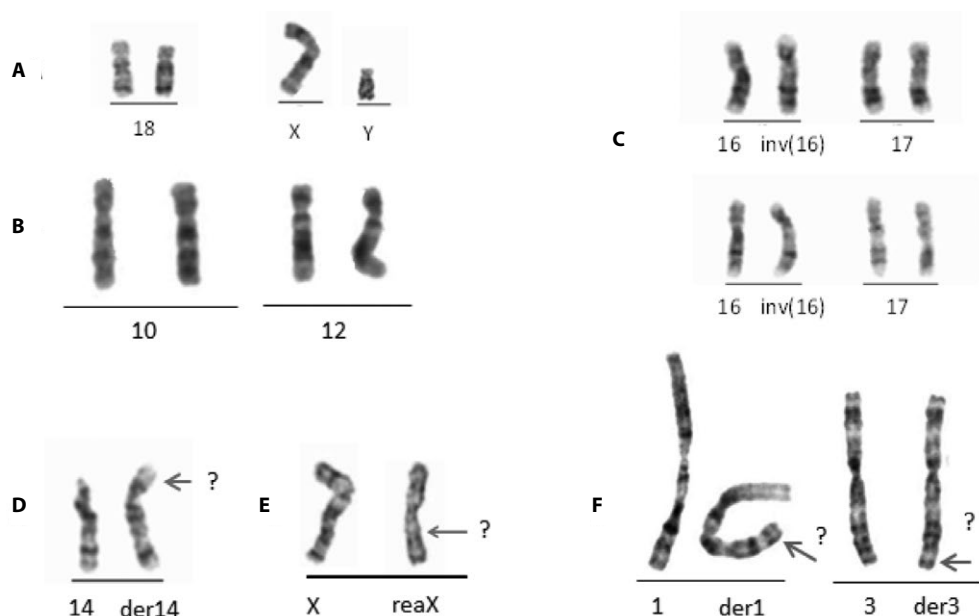


Рис. 5. Структурные аномалии хромосом, установленные при проведении дополнительных исследований (GTG) (фото из базы данных кариотипов пациентов РНПЦ «Мать и дитя»): А – der(18)t(X;18)(p22.31;q22.3); В – t(10;12)(p14;p13.2); С – inv(16)(p13.1q12.1); D – der(14)(qter-q24::p11.2-qter); E – i(X)(p10); F – t(1;3)(q42;q27)
Fig. 5. Structural chromosome abnormalities identified during additional testing (GTG) (photo from the Mother and Child patient karyotype database): A – der(18)t(X;18)(p22.31;q22.3); B – t(10;12)(p14;p13.2); C – inv(16)(p13.1q12.1); D – der(14)(qter-q24::p11.2-qter); E – i(X)(p10); F – t(1;3)(q42;q27)

и необходимости определения тактики ведения беременности был проведен амниоцентез и установлен кариотип культуры амниотической жидкости 46,XY,inv(16)(p13.1q12.1)dn. Необходимо понимать, что при анализе кариотипа АЖ отсутствие нормальной второй 16-й хромосомы закономерно привело к поиску аномальной 16-й хромосомы и тщательному прицельному исследованию GTG-бэндинга «третьей» 17-й хромосомы, которая была идентифицирована как inv(16). На основании уже полученной информации об измененной морфологии inv16 был проведен реанализ препаратов длительной культуры БВХ и оформлено новое заключение о кариотипе в БВХ – 47,XY,+inv(16)(p13.1q12.1)dn.

Также проблемным является выявление аберрации psu idic(Y)(q11.2), которая имитирует нормальную морфологию Y-хромосомы (средний размер Y-хромосомы без XG Yqh-/Yqh+, GTG-бэндинг, 1 сужение в области центромеры за счет инактивации второй центромеры). Учитывая наибольшую распространенность psu idic(Y)(q11.2) среди всех reaY у пациентов с нарушениями сперматогенеза и детей с нарушениями полового и задержкой физического развития, при анализе кариотипа необходимо обращать внимание на косвенные признаки reaY, обозначенные при описании ДД между XG и reaY, и данные результатов анализа локуса AZF [9].

Дифференциальная диагностика между разными типами структурных аномалий хромосом

Вовлечение в перестройки разных хромосомных локусов, имеющих идентичный GTG-бэндинг, может приводить к ошибкам интерпретации типа *rea*. При выявлении аберрации хромосом проводится определение типа *rea* и формирование окончательного заключения о том, является ли кариотип сбалансированным или несбалансированным с целью оценки прогноза для пациента и тактики оказания медицинской помощи. Установление типа сбалансированной *rea* также критически важно для определения вариантов хромосомного набора гамет в репродуктивном возрасте и планирования пренатальной цитогенетической диагностики. Как правило, для проведения ДД методом выбора является FISH с индивидуальным подбором ДНК-зондов согласно предполагаемому типу *rea*. Значительным преимуществом FISH является визуализация локализации флуоресцентно меченных хромосомных локусов и, следовательно, корректное установление *rea* и кариотипа.

В случае установления аберрации у ребенка или плода проводится СК крови родителей. Это позволяет не только определить характер наследования *rea* (родительское наследование или *de novo*), но при семейном носительстве может помочь в установлении точек разрывов и типа *rea*. Как правило, именно СК родителей при несбалансированном типе *rea* у ребенка/плода позволяет определить природу добавочного хромосомного материала в выявленной измененной хромосоме.

На рис. 5D представлена аномальная *rea*14 с добавочным материалом неизвестного происхождения на р-плече, которая была установлена в составе мозаичного кариотипа в крови женщины с 2 спонтанными прерываниями беременности. В данном случае с помощью FISH по причине подобию GTG-бэндинга локусов 14q24~qter и 21 хромосом проводилась ДД между робертсоновской транслокацией *der*(14;21)(q10;q10) и дупликацией дистального локуса длинного плеча 14-й хромосомы с транспозицией его в район р-плеча. По результатам комплексной оценки бэндинга и FISH была установлена *dup*14q24-qter – кариотип пациентки 46,XX/46,XX,*add*(14)(p10).*ish der*(14)(qter-q24::p11.2-qter)(SD14S1420++).

В случае выявления *rea*X у девочки с подозрением на синдром Шерешевского – Тернера (кариотип *mos* 46,X,*rea*(X)/46,XX) возникла необходимость в ДД между 2 типами *rea* – *del*(X)(q24~25) и *i*(X)(p10) (рис. 5E). В данном случае в результате проведенного исследования FISH было подтверждено носительство изохромосомы *i*(X)(p10). Необходимо подчеркнуть, что, даже если установлен несбалансированный характер *rea*, определение типа перестройки может иметь принципиальное значение в установлении генетического диагноза и прогноза для пациента. Например, носительство *i*(X)(p10) ассоциируется с развитием миелодиспластического синдрома и требует наблюдения у врача-гематолога [13].

Примером необходимости ДД между 2 сбалансированными типами *rea* является представленная на рис. 5F аберрация 1 и 3 хромосом. При СК было установлено изменение ширины бэндов 1q42 и 3q27 с визуальным сохранением целостности терминальных районов q-плеч обеих аномальных хромосом. Однако вследствие подобию бэндинга локусов 1qter и 3qter с помощью FISH была проведена ДД между реципрокной транслокацией *t*(1;3)(q42;q27) и инсерцией *ins*(3;1)(q27;q42.1q42.3) и подтверждено образование *t*(1;3).

Исследование маркерных хромосом sSMC после их выявления при СК неизменно требует проведения ДД в силу их малых размеров и неспецифического бэндинга. Диагностика хромосомной принадлежности и типа аберрации проводится с использованием определенных диагностических алгоритмов [14].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье представлены структурные аномалии хромосом и варианты хромосомного гетероморфизма, когда с помощью дополнительных исследований было изменено первичное заключение о кариотипе. Обсуждение и информирование о хромосомных аномалиях, которые трудно диагностируются при кариотипировании, и методах их качественной диагностики позволяют повысить достоверность будущих исследований кариотипа.

При выявлении измененной структуры хромосомного локуса в ряде случаев необходимо подтверждение предполагаемой хромосомной перестройки, проведение дифференциальной диагностики между вариантами гетероморфизма и структурной патологией или между разными типами перестроек. Благодаря анализу больших объемов кариотипов, накоплению данных об ассоциациях генотип-фенотип и развитию и внедрению в диагностическую практику генетических лабораторий комплексного подхода с использованием цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов (включая геномные технологии) появилось понимание того, что ограничения стандартного кариотипирования обусловлены не только ограничением уровня разрешения микроскопирования (более 5–10 млн п. н.), но и распространением эухроматиновых и гетерохроматиновых гетероморфизмов в популяции и подобием GTG-бэндинга разных хромосомных локусов. Таким образом, хромосомная мимикрия является одной из наиболее вероятных причин аналитических ошибок при СК. В связи с этим крайне важными факторами, определяющими окончательное заключение о хромосомной аберрации, являются анализ родословной и кариотипирование родителей пробанда, указание в заключении о кариотипе информации о числе проанализированных клеток и уровня разрешения бэндинга, включая данные о всех выполненных цитогенетических исследованиях, проведение таргетной дифференциальной диагностики согласно выявленному хромосомному изменению, обобщение результатов всех проведенных генетических исследований в одну общую картину и определение кариотипа в рамках совместного решения клинического генетика и цитогенетика.

Комплексный подход в исследовании структурной патологии хромосом значительно повышает эффективность клинической генетической лабораторной диагностики, тем самым увеличивая качество оказания генетической помощи пациентам.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. ACGS best practice guidelines for constitutional karyotype analysis and targeted chromosome analysis. The association for clinical genomic science. 2024. Available at: <https://www.acgs.uk.com/media/12611/acgs-best-practice-guidelines-for-constitutional-karyotype-analysis-and-targeted-chromosome-analysis-v10.pdf> (accessed 06.08.2024).
2. Wang Y., Liehr T. The Need for a Concert of Cytogenomic Methods in Chromosomal Research and Diagnostics. *Genes*. 2025;16(5):533–541. doi: doi.org/10.3390/genes16050533
3. Akkari Y. Science that lasts a lifetime: opinion. *The pathologist*. 2023. Available at: <https://thepathologist.com/issues/2023/articles/jun/science-that-lasts-a-lifetime> (accessed 06.09.2023).

4. Wyandt H.E., Tonk V.S. *Human chromosome variation: heteromorphism and polymorphism*. Dordrecht: Springer; 2011.
5. Liehr T. *Benign and pathological chromosomal imbalances (Microscopic and submicroscopic copy number variations CNVs in genetics and counseling)*. San Diego: Elsevier Inc; 2014.
6. McGowan-Jordan J., Hastings R.J., Moore S. (eds) *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2020*. Basel: S Karger Ag; 2020.
7. Dobek W.A., Kim H-G., Walls C.A. Long term follow-up of females with unbalanced X;Y translocations – reproductive and nonreproductive consequences. *Molecular cytogenetics*. 2015;8(13):1–10. doi: 10.11186/s13039-015-0112-0
8. Trebka E., Gusina N. Structural anomalies of the Y-chromosome: diagnostic problems. *Laboratory diagnostics Eastern Europe*. 2019;8(3):363–380. (in Russian)
9. Trebka E. *Genetic nature of reproductive disorders in men* (PhD Thesis), Minsk, 2021;202 p. (in Russian)
10. Knebel S., Pasantes J.J., Thi D.A.D. Heterogeneity of pericentric inversions of the human Y chromosome. *Cytogenetic and genome research*. 2011;132:219–226. doi: 10.1159/000322080
11. Gardner R.J.M., Amor D.J. *Chromosomal abnormalities and genetic counseling*. 5th ed. New York: Oxford Univ. Press; 2018.
12. Gersen S.L., Keagle M.B. *The principles of clinical cytogenetics*. 3rd ed. New York: Springer; 2013.
13. Penther D., Etancelin P., Lusina D. Isolated isochromosomes i(X)(p10) and idic(X)(q13) are associated with myeloid malignancies and dysplastic features. *American journal of hematology*. 2019;11:285–288. doi: 10.1002/ajh.25601
14. *ChromosOmics: Database* (electronic resource). Available at: <https://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/0-Start.html> (accessed 12.04.2024).



<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.024>



Волочник Е.В.✉, Капуза Д.Р., Вшивкова О.С., Мелешко А.Н.

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

Эволюция кариотипа лейкоэмических клеток при рецидиве острого лимфобластного лейкоза из В-клеток-предшественников у пациентов детского и молодого взрослого возраста

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Волочник Е.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор и обработка данных, обзор литературы, написание текста; Капуза Д.Р. – сбор и обработка данных; Вшивкова О.С. – редактирование, написание текста; Мелешко А.Н. – редактирование, написание текста.

Подана: 06.10.2025

Принята: 26.01.2026

Контакты: valochnikalena@gmail.com

Резюме

Введение. Острый лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников (ВП-ОЛЛ) – поликлональное заболевание, при рецидиве которого один или несколько субклонов приобретают дополнительные генетические изменения и становятся родоначальниками рецидива. В настоящее время остается много вопросов о генетических нарушениях, вызывающих как первичный, так и рецидивирующий лейкоз у отдельных пациентов. Изучение динамики хромосомных aberrаций приведет к лучшему пониманию биологических механизмов, ответственных за резистентность лейкоэмических клеток к терапии.

Цель. Анализ изменений кариотипа лейкоэмических клеток в парных случаях ВП-ОЛЛ у пациентов детского и молодого взрослого возраста.

Материалы и методы. В исследование вошли 68 парных случаев первичный лейкоз / рецидив и 18 парных случаев рецидив/рецидив у пациентов с ВП-ОЛЛ. Возраст пациентов выборки колебался от 0 до 28 лет (медиана – 7 лет), соотношение по полу мужской : женский = 1,13:1. Анализ хромосомных перестроек проводили методами стандартного цитогенетического исследования и флуоресцентной *in situ* гибридизации.

Результаты. Изменение кариотипа выявлено в 83,8% парных случаев первичный лейкоз / рецидив и в 72,2% случаев рецидив/рецидив ВП-ОЛЛ. При этом в 67,6% имеется клональная прогрессия как в виде только появления новых цитогенетических aberrаций (38,2%), так и в сочетании с потерей некоторых aberrаций (29,4%). Показано увеличение частоты встречаемости сложных кариотипов, а также количества субклонов при рецидиве заболевания. Так, в парах первичный лейкоз / рецидив происходит увеличение частоты встречаемости сложного кариотипа с ≥ 3 структурными aberrациями с 27,9% до 45,6% ($p=0,033$), а наличие ≥ 2 aberrантных субклонов при первом рецидиве возрастало с 19,1% до 41,5% ($p=0,0017$). Наименьшее изменение сложности кариотипа (как по частоте сложных кариотипов, так и по количеству aberrантных субклонов) обнаружено в группе KMT2A+ ($p>0,05$), наибольшее – в группе

без рекуррентных аберраций ($p < 0,05$). Выявлены дополнительные хромосомные аберрации, частота которых возрастает при рецидиве в группе без рекуррентных аберраций, – gain1q, del6q, loss9p, imb17p/17q.

Заключение. Несмотря на общую тенденцию к усложнению кариотипа и преобладанию клональной прогрессии, разные генетические варианты ВП-ОЛЛ демонстрируют отличия в изменении кариотипа как по сложности кариотипа на метафазу, так и по субклональной структуре, поэтому дальнейшие исследования необходимо проводить в разных вариантах лейкоза по отдельности. Также большая часть выявленных изменений кариотипа, сохраняющихся и вновь возникающих при рецидиве, обнаруживается еще при первичной диагностике и может быть рассмотрена как потенциальные предикторы рецидива. Анализ этих маркеров, а также скрытых вариантов кариотипа позволит улучшить диагностику потенциально неблагоприятных вариантов кариотипа еще на этапе первичной диагностики.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, рецидив, дополнительные хромосомные аберрации, сложный кариотип, клональная эволюция

Valochnik A.✉, Kapuza D., Vshyukova V., Meleshko A.

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

Karyotype Evolution in Leukemic Cells at Relapse of B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia in Pediatric and Young Adult Patients

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Valochnik A. – study concept and design, data collection and processing, literature review, text writing, editing; Kapuza D. – data collection and processing; Vshyukova V. – text writing, editing; Meleshko A. – text writing, editing.

Submitted: 06.10.2025

Accepted: 26.01.2026

Contacts: valochnikkalena@gmail.com

Abstract

Introduction. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) is a polyclonal disease in which, upon relapse, one or several subclones acquire additional genetic alterations and become progenitors of the disease recurrence. Currently, many questions remain open about genetic changes causing both primary and relapsed leukemia. Investigating trends in chromosomal aberrations will lead to a better understanding of biological mechanisms responsible for leukemic cell resistance against therapy.

Purpose. To analyze karyotype alterations in leukemic cells from paired BCP-ALL samples in pediatric and young adult patients.

Materials and methods. The study included 68 paired primary diagnosis/relapse cases and 18 paired relapse/relapse cases among BCP-ALL patients. The age of the cohort ranged from 0 to 28 years (with median of 7 years). The sex ratio between male and female was 1.13:1. Chromosomal rearrangements were analyzed by conventional cytogenetic assay and fluorescence in situ hybridization.



Results. Karyotype changes were detected in 83.8% of paired primary diagnosis/relapse cases and 72.2% of relapse/relapse cases. Clonal progression was observed in 67.6% of cases: both as the appearance of new cytogenetic aberrations alone (38.2%) or in combination with the loss of some aberrations (29.4%). An increase in frequency of complex karyotypes, as well as in the number of subclones, was demonstrated at relapse. In primary diagnosis/relapse pairs, the frequency of complex karyotypes with ≥ 3 structural aberrations increased from 27.9% to 45.6% ($p=0.033$), and the presence of ≥ 2 aberrant subclones at first relapse increased from 19.1% to 41.5% ($p=0.0017$). The smallest change of karyotype complexity (both the frequency of complex karyotypes and the number of aberrant subclones) was found in the KMT2A+ BCP-ALL ($p>0.05$), while the largest change was observed in the BCP-ALL without recurrent aberrations ($p<0.05$). Additional chromosomal aberrations with increased frequency at relapse were identified in the BCP-ALL without recurrent aberrations: gain1q, del6q, loss9p, imb17p/17q.

Conclusion. Despite the overall trend toward the karyotype complexity and the predominance of clonal progression, different genetic subtypes of BCP-ALL demonstrate distinction in karyotype changes, both in karyotype complexity from metaphase and subclonal architecture. Therefore, further studies should be conducted separately for each leukemia subtype. Furthermore, most karyotype alterations, both persisting and newly emerging at relapse, are already detectable at initial diagnosis and may be considered potential predictors of relapse. Analysis of these markers, including hidden karyotype variants, will improve the early identification of potentially unfavorable karyotypes at the initial diagnostic stage.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, relapse, additional chromosomal alterations, complex karyotype, clonal evolution

■ ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных причин неудач в лечении и смерти детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) является рецидив заболевания, который имеет биологические и клинические различия с впервые диагностированными лейкозными клетками, включая появление новых хромосомных aberrаций, генных мутаций и снижение чувствительности к химиотерапевтическим препаратам. В настоящее время остается много вопросов о генетических нарушениях, вызывающих как первичный, так и рецидивирующий лейкоз у отдельных пациентов. При этом большую роль в развитии рецидива играет цитогенетическая эволюция лейкемических клеток, так называемая клональная эволюция кариотипа (КЭ). Данный термин был введен у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом, и большинство дальнейших исследований, посвященных КЭ, проводилось у пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и миелодиспластическим синдромом. Изучение КЭ при ОЛЛ началось относительно недавно, и данные получены преимущественно с использованием молекулярных методов исследования и для взрослых пациентов.

Чаще всего основателем рецидива является минорный субклон клеток, выявляемый при первичной диагностике (50%), реже – основной субклон (30%), или рецидив имеет полисубклональное происхождение (18%) [1]. Возникновение генетических

нарушений случайно, и, наряду со значимыми изменениями генотипа лейкоэмической клетки, на этапе первичной диагностики выявляется множество дополнительных хромосомных aberrаций (ДХА), которые могут содержаться в исходном лейкоэмическом клоне и не играть решающей роли в развитии заболевания, однако давать селективное преимущество данному клону при прогрессировании заболевания [2]. Дихотомическая эволюция и сдвиги в клональной архитектуре между диагнозом и рецидивом были продемонстрированы в исследовании ОЛЛ Anderson et al. (2011) с использованием флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). В этом исследовании клональная архитектура кариотипа при рецидиве ОЛЛ отличалась от той, что наблюдалась при первичной диагностике, причем рецидив происходил как из основных, так и из минорных субклонов. Эти минорные субклоны несли в себе геномные изменения, приобретенные позднее в ходе развития лейкемии, которые потенциально могли способствовать клональному дрейфу, но вряд ли являлись существенными для инициации первичного заболевания. Однако селективное давление предшествующего лечения могло обеспечить конкурентное преимущество субклонам, которые несли данные изменения, что позволило им избирательно выживать и в конечном итоге привело к неудаче лечения [3]. Показано, что мутации в рецидив-ассоциированных генах, а именно в генах CREBBP, NOTCH1 и генах, принадлежащих к семейству Ras, часто могут быть прослежены до незначительных субклонов в диагностическом образце [1–5].

Рецидив может как возникать из незначительных минорных субклонов, не обнаруживаемых обычными методами исследования, так и развиваться из лейкоэмических клеток-предшественников при приобретении ими дополнительных генетических изменений [1, 4, 6]. Так, Mullighan et al. (2008) провели исследование генома 61 пациента с В-ОЛЛ и показали, что в большинстве образцов имелись различия по содержанию числа копий генов и, несмотря на генетическое сходство между первичными клетками и рецидивом, в 58% случаев с рецидивом отсутствовали некоторые изменения в количестве копий генов, присутствующих при первичной диагностике, что возможно при происхождении рецидива из предка лейкоэмических клеток. При этом aberrации, приобретенные при рецидиве, преимущественно влияли на гены, участвующие в регуляции клеточного цикла и развитии В-клеток (PAX5, IKZF1, EBF1, RAG1/2). Ретроспективный анализ первичных образцов показал, что рецидивный предковый клон часто присутствовал в качестве незначительной субпопуляции при постановке диагноза. Это свидетельствует о разветвленной эволюции ОЛЛ и демонстрирует влияние лекарственных препаратов на эволюционную траекторию ОЛЛ, устраняющих действующий клон [6].

Помимо изменения клонального состава в лейкоэмических клетках продолжается процесс накопления хромосомных aberrаций и генных мутаций, в том числе в доминирующем клоне. Так, изучение кариотипов при посттрансплантационных рецидивах (ПТР) показало, что изменение кариотипа происходит у 72% пациентов с ОЛЛ и у 71% пациентов с ОМЛ, причем большинство изменений касались структурных хромосомных нарушений (в 45% случаев). Было показано, что в ПТР чаще выявляют сложный кариотип (СК) с ≥ 3 и ≥ 5 хромосомными нарушениями на клетку, чем до алло-ТГСК (62% и 33% для СК ≥ 3 , $p=0,03$, и 48% и 27% для СК ≥ 5 , $p=0,008$). Также в данном исследовании показано, что СК с ≥ 3 цитогенетическими нарушениями выявлялся чаще у пациентов с неблагоприятными цитогенетическими нарушениями



(перестройками генов KMT2A, MECOM, а также транслокациями t(6;9), t(9;22), t(4;11)), чем у пациентов с благоприятной или промежуточной группой риска (81% против 39%, $p=0,0002$) и преимущественно при ОМЛ (80% против 29%, $p=0,001$) [7].

Кроме того, лейкоэмический пул клеток состоит из нескольких субклонов, что также может влиять на поведение опухолевых клеток, так как такая гетерогенность обеспечивает отбор материалов для селекции. Показано, что наличие 2 и более аномальных цитогенетических клонов обнаруживается у трети исследованных пациентов при ПТР и является независимым неблагоприятным прогностическим фактором, отрицательно влияющим на показатели ОБ у пациентов с ПТР [8]. Таким образом, оценка субклональной структуры лейкоэмического пула клеток становится не менее важной, чем изучение цитогенетических изменений в пределах одного кариотипа.

Исследование изменений кариотипа лейкоэмического клона клеток при рецидиве заболевания в сравнении с первичной диагностикой позволяет выделить хромосомные изменения, имеющие вероятное селективное преимущество при лекарственной терапии. В случае сохранения ДХА при рецидиве можно предполагать наличие адаптивной роли у данного маркера. В этом ключе можно рассматривать и повторяющиеся генетические aberrации, возникающие при рецидиве *de novo*. В случае частой потери маркера можно предположить отсутствие его адаптивной роли. Факторы, не инициирующие заболевание, но способные увеличить адаптивную приспособленность опухолевого клона, относят ко вторичным хромосомным aberrациям (ХА). Интересным представляется и изучение клональной архитектуры и эволюционных путей при развитии рецидива.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ изменений кариотипа лейкоэмических клеток в парных случаях ВП-ОЛЛ у пациентов детского и молодого взрослого возраста.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошло 68 парных случаев первичный лейкоз / рецидив заболевания (47 пар ВП-ОЛЛ без специфических aberrаций, 11 – с t(11;v)/KMT2A::v, 7 – с t(9;22)/BCR::ABL1, 2 – с ETV6::RUNX1, 1 – с t(1;19)/TCF3::PBX1) и 18 пар рецидив/рецидив (15 – ВП-ОЛЛ без специфических aberrаций, 2 – с t(11;v)/KMT2A::v, 1 – с t(9;22)/BCR::ABL1) пациентов с ВП-ОЛЛ от новорожденных до 28 лет (медиана – 7 лет). Соотношение по полу мужской : женский = 1,13:1. Наличие специфических хромосомных перестроек E2A::PBX1, ETV6::RUNX1, BCR::ABL1 и KMT2A::v подтверждалось методами флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и ПЦР. Кариотипирование проводилось на метафазных пластинках ночной культуры КМ с использованием метода GTG (англ. G-bands by trypsin using Giemsa). Регистрация данных проводилась в соответствии с рекомендациями международной системы цитогеномной номенклатуры человека (ISCN) [9]. Клональными считались структурные перестройки или трисомии в ≥ 2 метафазных пластинках или в ≥ 3 метафазных пластинках для моносомий [9]. В рецидиве при обнаружении одной метафазной пластинки с кариотипом, полностью совпадающим с выявленным при первичной диагностике, данная метафазная пластинка учитывалась как минорный субклон исходной лейкоэмической популяции клеток. Статистическая обработка осуществлялась при помощи пакета Statistica 7.0, статистически значимым являлось значение $p\text{-value} < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменение кариотипа выявлено в 83,8% (57/68) парных случаев первичный лейкоз / рецидив и в 72,2% (13/18) парных случаев рецидив 1 / рецидив 2. По характеру изменений выделяли следующие варианты КЭ кариотипа: клональная прогрессия (КП) – появление новых структурных или числовых изменений, клональная регрессия (КР) – потеря хромосомных aberrаций (ХА), а также сочетание обоих вариантов (КП+КР) (рис. 1).

Для большинства проанализированных пар была характерна КП, которая определялась в 67,6% (46/68) парных случаев первичный лейкоз / рецидив и в 61,1% (11/18) случаев рецидив/рецидив (при этом КП выявлялась чаще без сочетания с КР). Случаи КР без сочетания с КП установлены всего в 16,2% (11/68) и 11,1% (2/18) соответственно. При этом в основном происходила потеря фоновых, не повторяющихся aberrаций. Вызывает интерес то обстоятельство, что в парах рецидив/рецидив наблюдалась большая частота случаев без изменения кариотипа, чем в парах первичный лейкоз / рецидив, что, возможно, связано с большей адаптацией клеток рецидива 1 к действию цитостатика в сравнении с первичными лейкозами. Косвенно это можно проследить по эволюции кариотипа для тех случаев, где известен кариотип и при первичной диагностике, и в нескольких дальнейших рецидивах (первичный лейкоз / рецидив 1 / рецидив 2 – у 12 пациентов, и + рецидив 3 – у 2 пациентов). Из них у 11 (91,7%) пациентов наблюдалось изменение кариотипа между первичной диагностикой и хотя бы одним из рецидивов заболевания. При этом в 66,7% (8/12) наблюдали изменение между первичной диагностикой и рецидивом 1, дальнейшие изменения рецидив/рецидив происходят в 50% случаев (6/12). Только в 25% (3/12) случаев не выявлено изменения в парах первичный лейкоз / рецидив 1, но имеются изменения в парах рецидив 1 / рецидив 2. Таким образом, большинство ДХА, ассоциированных с рецидивом, были выявлены уже при первичной диагностике или при рецидиве 1, и динамика приобретения новых ХА снижается.

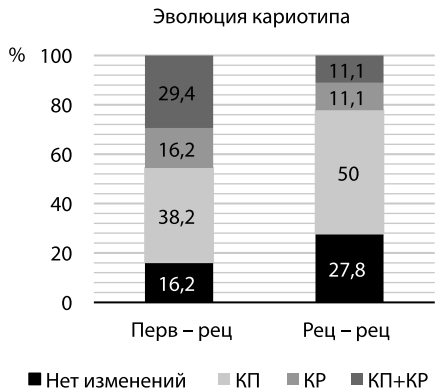


Рис. 1. Частота встречаемости вариантов эволюции кариотипа лейкоэмических клеток в парных случаях первичный лейкоз / рецидив (n=68) и рецидив/рецидив (n=18)

Fig. 1. Frequency of karyotype evolution variants in paired samples: primary/relapse (n=68) and relapse/relapse (n=18) cases

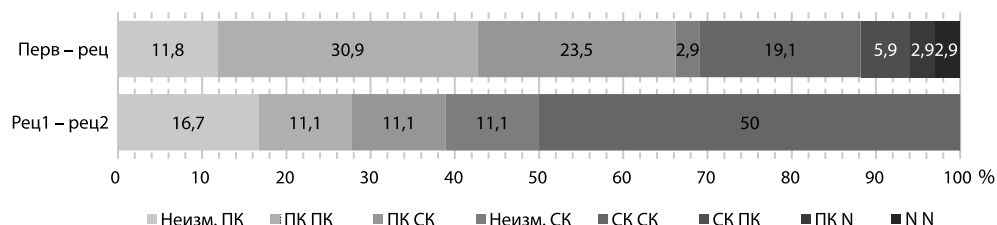


Рис. 2. Изменение сложности кариотипа в парных случаях: СК – вариант сложного кариотипа с ≥ 3 СХА; ПК – простой кариотип; N – нормальный кариотип
Fig. 2. Changes in karyotype complexity in paired cases: СК – complex karyotype with ≥ 3 structural chromosomal aberrations; ПК – simple karyotype; N – normal karyotype

Чтобы изучить динамику изменений кариотипа по переходу из простого кариотипа (ПК) в СК или наоборот, были выделены следующие варианты: неизмененный ПК; изменение ПК с образованием ПК; переход из нормального или ПК в СК; неизмененный СК; изменение СК с образованием СК; упрощение СК до ПК; переход из ПК в нормальный кариотип; неизмененный нормальный кариотип. При этом СК оценивался как ≥ 3 несвязанных структурных хромосомных aberrаций (≥ 3 СХА), а ПК – как любой aberrантный кариотип с ≤ 2 СХА (рис. 2).

В парах первичный лейкоз / рецидив 1 изменение от ПК к СК выявлено в 23,5% случаев, еще в 22% изначально был выявлен и сохранялся СК, и только в 5,9% наблюдался переход от СК к ПК при потере фоновых структурных ДХА. При последующих рецидивах упрощение кариотипа от СК к ПК не выявлено, при этом в парах рецидив/рецидив увеличивалась доля с СК (72,2%) как неизменным от первого кариотипа, так и с изменениями. Таким образом, эволюция кариотипа идет в сторону накопления СК в последующих рецидивах.

При проведении оценки динамики количественного состава популяций внутри лейкоемического пула клеток определяли варианты с увеличением, уменьшением или неизменным субпопуляционным составом в последующем после терапии рецидиве (рис. 3).

Почти в трети случаев в парах первичный лейкоз / рецидив происходит увеличение количества выявляемых субклонов, а в последующих рецидивах усложнение субпопуляционного состава несколько падает.

С учетом того, что многие случаи со сложной клональной архитектурой при первичной диагностике сохраняют ее и происходит дальнейшее усложнение у трети случаев при рецидиве 1, было проведено сравнение частот случаев с одним и с ≥ 2 субклонами. Случаи были поделены на 2 условные группы – с наличием одного выявляемого клона клеток и с ≥ 2 aberrантными субклонами. В парах первичный лейкоз / рецидив ($n=68$) наличие ≥ 2 субклонов было выявлено в 19,1% и 41,5% соответственно ($p=0,0017$), а в группе рецидив/рецидив ($n=18$) ≥ 2 aberrантных субклона выявлено в 44,4% и 50% соответственно ($p>0,1$). Таким образом, несмотря на разную клональную архитектуру лейкоемического пула клеток, в большей части случаев наблюдается усложнение субклональной структуры при первом рецидиве, однако в последующих рецидивах усложнение субклональной структуры снижается.

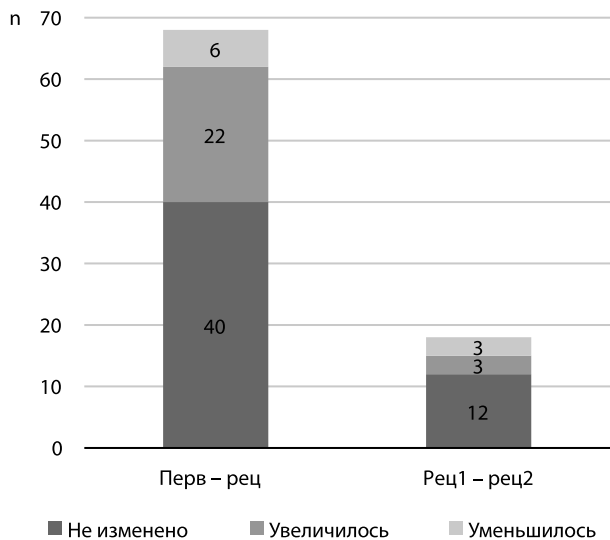


Рис. 3. Изменение количества цитогенетически выявляемых субклонов
Fig. 3. Changes in the number of cytogenetically detectable subclones

Большинство исследований клональной эволюции посвящено эволюции клонов при ОЛЛ или ОМЛ в целом без выделения по отдельным подтипам. Однако генетически различные варианты лейкозов могут вести себя по-разному в зависимости от роли ДХА для прогрессии лейкоза. В нашем исследовании был проведен детализированный анализ определенных цитогенетических изменений отдельно для групп с рекуррентными транслокациями с $t(11;v)/KMT2A::v$, $t(9;22)/BCR::ABL1$, $ETV6::RUNX1$, $t(1;19)/TCF3::PBX1$ и в группе ВП-ОЛЛ без данных перестроек.

При $t(11;v)/KMT2A::v$ только в 3 парах (27,3%) из 11 не было выявлено изменений кариотипа. В 6 (54,5%) наблюдалась КП с появлением дополнительных структурных aberrаций (в том числе в 2 случаях – ранее не выявляемая делеция 7p22) и в 2 (18,2%) – КР с элиминацией ХА из основного клона (по одному случаю – элиминация $del6q$ и трисомии Х). Однако, несмотря на данные изменения, в 90,9% (10/11) случаев $KMT2A+$ ВП-ОЛЛ сохранялся простой кариотип, и только 1 случай имел СК (более 3 структурных aberrаций при первичной диагностике, с появлением дополнительных СХА при рецидиве). Незначительно усложнялась и субклональная структура рецидива – при первичной диагностике только в 1 случае выявлено ≥ 2 субклона, а при рецидиве – в 4 (9,1% и 36,4% соответственно) ($p>0,1$).

В отличие от $KMT2A+$ ВП-ОЛЛ, при $BCR::ABL1+$ ВП-ОЛЛ кариотип изначально имеет более сложную структуру (3/7, 42,9%), которая незначительно усложнялась при рецидиве заболевания (4/7, 57,1%) ($p>0,1$). При этом в данном варианте лейкоза появление случаев с ≥ 2 субклонами происходит с большей частотой (1/7, 14,3% при первичном и 5/7, 71,4% при рецидиве, $p<0,05$), чем при $KMT2A+$ ВП-ОЛЛ.

С $ETV6::RUNX1+$ ВП-ОЛЛ в исследование вошло 2 парных случая, в одном из которых произошла потеря случайной ХА с приобретением делеции интактного гена $ETV6$ – $del12p/ETV6$ (выявляется более чем в 50% всех первичных $ETV6::RUNX1+$)



[10], при этом исходный субклон без делеции интактной копии гена ETV6 сохраняется в виде меньшего по количеству субклона. Учитывая это, можно предположить, что наличие делеции интактной копии гена ETV6 дает преимущество в сравнении с клоном без делеции. Во втором случае ETV6::RUNX1+ ВП-ОЛЛ при рецидиве сохранился один из исходных субклонов (околотетраплоидный), при этом остальные три исходных субклона, выявленных при первичной диагностике, не детектированы при анализе методом FISH. Также был элиминирован и вариант с низкой гипердипloidией, содержащий t(8;10)(q24.2;q21.2)/MYC+, диагностированный в первичном лейкозе. Так как при рецидиве реаранжировка гена MYC не выявлена методом FISH даже в минимальном количестве, это может говорить о том, что данная генетическая перестройка при ETV6::RUNX1+ ВП-ОЛЛ не дает селективного преимущества при химиотерапии.

При TCF3::PBX1+ ВП-ОЛЛ наблюдали только 1 парный случай, при рецидиве которого произошло усложнение кариотипа с ПК с единичной t(1;19) без ДХА до СК с 3 субклонами.

Наибольшая по количеству вошедших в исследование парных случаев группа ВП-ОЛЛ без рекуррентных aberrаций (n=47) включает в себя случаи как с высокой гипердипloidией (ВГ), так и с гипопloidией ≤ 44 . Анализировалось поведение в парных случаях тех цитогенетических изменений, которые были выявлены с высокой частотой при первичной диагностике когорты пациентов Республики Беларусь (n=398) в нашем предыдущем исследовании [10] (см. таблицу).

При рецидиве заболевания не наблюдается значительных изменений по модальному числу хромосом (МЧХ), несмотря на потерю/добавление случайных числовых или структурных ХА. Так, при рецидиве добавилось 2 случая с ВГ – один за счет появления добавочных хромосом перешел из группы с НГ, во втором случае при первичной диагностике выявлен нормальный кариотип в 20 метафазных пластинках, где, вероятно, при первичной диагностике не была диагностирована скрытая ВГ. Кроме того, добавилось 2 случая с гипопloidией ≤ 44 , при которых первично были диагностированы околотри- и околотетраплоидный кариотипы методом GTG. Возможно, в данных случаях при первичной диагностике присутствовал минорный гипопloidный клон клеток, не диагностированный стандартным кариотипированием. Описанные случаи показывают важность использования при первичной диагностике дополнительной панели FISH для определения скрытых анеупloidий.

Интересен случай, имеющий при первичной диагностике 1 гипопloidный клон с МЧХ = 27, при рецидиве которого выявлено 5 субклонов, 2 из которых имели гипопloidный набор хромосом (МЧХ=27) и 3 – с удвоением гипопloidного клона (2 субклона с ВГ-кариотипом с МЧХ = 54 и 55 хромосом и 1 субклон с МЧХ = 50 хромосом). При этом методом FISH при первичной диагностике не выявлена гиперпloidия, т. е. удвоение хромосом произошло позже, при прогрессировании в рецидив. С учетом того, что количественно по результатам интерфазного FISH при рецидиве гипо- и гиперпloidные субклоны встречаются примерно с равной частотой, в данном случае гипопloidный клон не демонстрирует преимущества в клональной экспансии перед «удвоенным» с гиперпloidией. Еще один вариант эволюционных путей демонстрирует случай с гипопloidией (МЧХ = 37) с единственным клоном при первичной диагностике, который сохраняется при рецидиве. Однако при рецидиве дополнительно был выявлен новый клон клеток, имеющий псевдодипloidный кариотип с делецией bq.

Цитогенетические изменения в парных случаях первичный лейкоз / рецидив (n=47) в группе ВП-ОЛЛ без рекуррентных ХА (t(11;v)/KMT2A::v, t(9;22)/BCR::ABL1, ETV6::RUNX1, t(1;19)/TCF3::PBX1)
Cytogenetic alterations in paired primary diagnose/relapse cases (n=47) of BCP-ALL without recurrent chromosomal abnormalities (t(11;v)/KMT2A::v, t(9;22)/BCR::ABL1, ETV6::RUNX1, t(1;19)/TCF3::PBX1)

Цитогенетические нарушения	Первичный лейкоз, абс. (%)	Рецидив, абс. (%)
Варианты кариотипа		
Высокая гипердиплоидия (ВГ) 51–65 хромосом	18 (38,3)	20 (42,6)
Низкая гипердиплоидия (НГ) 47–50 хромосом	6 (12,8)	5 (10,6)
Гипоплоидия =45	3 (6,4)	5 (10,6)
Гипоплоидия <45	4 (8,5)	6 (12,8)
СК ≥1 СХА*	16 (34)	31 (66)
СК ≥3 СХА*	13 (27,7)	22 (46,8)
Структурные аберрации		
delXp	3 (6,4)	4 (8,5)
t1q	4 (8,5)	6 (12,8)
dup1q	2 (4,3)	3 (6,4)
del4q	2 (4,3)	3 (6,4)
del6q	8 (17)	10 (21,3)
t7q	1 (2,1)	3 (6,4)
der9p/loss9p	8 (17)	10 (21,3)
der12p/loss12p	3 (6,4)	3 (6,4)
t14q	3 (6,4)	4 (8,5)
der17p/loss17p	3 (6,4)	6 (12,8)
i17q	3 (6,4)	5 (10,6)
t19p	4 (8,5)	3 (6,4)

Примечания: *анализировались 2 варианта СК: 1 – с любыми ≥3 аберрациями, включая как минимум 1 структурную (СК ≥1 СХА), 2 – с любыми ≥3 структурными аберрациями (СК ≥3 СХА).

Возможны 2 пути возникновения данного поликлонального варианта рецидива: первый – из 2 ранее присутствовавших субклонов (оба субклона были при манифестации заболевания, но один был минорным и не диагностировался стандартными цитогенетическими методами), второй – развитие данного субклона произошло из ранних клеток-предшественников лейкоза, не обладающих гипоплоидией, в результате цитостатического воздействия при терапии первичного лейкоза, и дальнейшее развитие данного клона шло параллельно с первично диагностированным вариантом. К сожалению, нам не известен профиль молекулярных изменений, чтобы возможно было определить, какой из двух вариантов был в данном случае.

В группе ВП-ОЛЛ без рекуррентных ХА выявлено увеличение частоты СК при рецидиве заболевания (см. таблицу). Так, при рецидиве наблюдается увеличение количества случаев обоих вариантов СК как для СК ≥1 СХА (p=0,002), так и для СК ≥3 СХА (p=0,055). При этом сохранялись не только клонообразующие перестройки (PAX5, IGH, CRLF2, PDGFRB), но и ДХА, которые ранее были выявлены с высокой частотой в когортном исследовании первичных ВП-ОЛЛ [10]. А для некоторых ДХА даже наблюдается увеличение количества случаев при рецидиве.



Так, аберрации длинного плеча 1 хромосомы при первичной диагностике представлены в виде дупликаций и транслокаций. При этом в 3 случаях из 4 выявлены несбалансированные транслокации, в результате чего в кариотипе произошло увеличение генетического материала 1q (gain1q). Все 6 первично диагностированных случая с t1q и dup1q имели одинаковую точку среди точек разрыва – 1q21. При рецидиве заболевания все дупликации и несбалансированные транслокации были сохранены, однако в 3 случаях de novo появились случаи с аберрациями 1q: с dup1q (1 пациент) и der(1)t(1;1)(p36;q22) (2 пациента). В результате вновь возникшей несбалансированной транслокации t(1;1) в кариотипе лейкемических клеток также появляется хромосомный дисбаланс 1p–/1q+. Учитывая полученные данные, можно допустить, что дисбаланс 1p–/1q+ или gain1q может являться важным адаптивным генетическим изменением для развития рецидива.

Делеция длинного плеча 6 хромосомы сохраняется в большинстве случаев рецидива (7/8, 87,5%). Однако произошедшая потеря del6q в одном случае может быть связана с происхождением рецидива из лейкемических клеток-предшественников без делеции. Так как в остальных случаях делеция сохранялась и в 3 случаях произошло ее появление при рецидиве заболевания, допустимо предположить не простую элиминацию данного маркера, а прогрессию изначального клона в рецидив с накоплением иных дополнительных генетических нарушений.

Наиболее частыми ХА в исследованной группе были аберрации с вовлечением короткого плеча 9 хромосомы – в 19,1% (9/47) и 23,4% (11/47) случаев при первичной диагностике и рецидиве соответственно. Выявленные варианты аберраций 9p весьма вариабельны и представлены как просто делецией 9p, так и различными вариантами транслокаций. При этом в подавляющем большинстве случаев с абберрантной 9 хромосомой (8/47 первичных лейкозов и 10/47 рецидивов) наличие аберрации приводило к потере терминального региона 9p с потерей гена CDKN2A. Из них в 4 случаях точка разрыва приходилась на ген PAX5, при этом в 3 – с образованием несбалансированной перестройки, таким образом, в этих случаях происходит одновременно несколько важных для патогенеза событий – перестройка PAX5 и делеция генов CDKN2A/B и JAK2.

Аберрации 17 хромосомы выявлены в виде i17q в 3 первичных случаях и 5 случаях рецидива (появилась у 2 пациентов с ВГ вместо трисомии 17 хромосомы как добавочная i17q с сохранением двух нормальных 17 хромосом), в результате чего происходит потеря 17p и увеличение генетического материала 17q. Кроме того, при рецидиве дополнительно появляется по одному случаю несбалансированной перестройки с потерей 17p и dup17q. Потери структурных аберраций 17 хромосомы при рецидиве заболевания не было выявлено, что указывает на значимость дисбаланса короткого и длинного плеча 17 хромосомы (как и хромосомы 1) для адаптации и экспансии лейкемического клона.

Проследить поведение повторяющихся числовых аберраций в данном исследовании не удалось из-за малого количества случаев. Так, в группе ВП-ОЛЛ с исключением ВГ и гипоплоидии ≤ 44 (n=23) только моносомия 9 хромосомы была выявлена и сохранялась в 2 случаях. Остальные повторяющиеся моносомии и трисомии или не вошли в исследуемую группу, или выявлены в единичных случаях, причем не все сохранялись при рецидиве, что не позволяет делать какие-то выводы о поведении анеусомий при прогрессии. Для групп ВГ и гипоплоидий ≤ 44 , как описано ранее,

сохранялось общее количество МЧХ, при этом имелись потери/приобретения новых хромосом, однако каких-то закономерностей выявлено не было.

Изменение количественного состава субклонов в группе ВП-ОЛЛ без рекуррентных аберраций показало увеличение количества субклонов при рецидиве с 14,8% (7/47) до 40,4% (19/28) ($p=0,006$), как и для всех ВП-ОЛЛ, за исключением КМТ2А+ВП-ОЛЛ.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в данных литературы, нами была выявлена высокая частота изменений кариотипа при рецидиве заболеваний (83,8%), при этом частота была даже несколько выше, чем описано для пациентов детского возраста (64%) [8] или взрослых пациентов (72%) с ОЛЛ после ПТР [7]. Также в выполненном исследовании подтверждаются данные о том, что происходит увеличение случаев с СК при рецидиве заболевания. Оценка динамики перехода от ПК к СК показала, что у 45,5% пациентов при рецидиве выявлен СК. Из них почти половина (22%) ранее имели СК, который только в 2,9% сохранялся неизменным, и в 19,1% приобретались или элиминировались некоторые цитогенетические изменения, в том числе и с увеличением количества структурных аберраций на одну клетку. Если в парах первичный лейкоз / рецидив имелось небольшое количество с переходом из СК в ПК, то в парах рецидив/рецидив таких случаев не обнаружено. Также в 23,5% случаев с ПК при первичной диагностике выявили усложнение структуры кариотипа до СК с ≥ 3 СХА. Анализ пар рецидив/рецидив хоть и демонстрирует снижение прироста частоты СК за счет ПК из рецидива 1 (11,1%), однако суммарно частота СК во втором и последующих рецидивах выше и составляет 72,2% за счет того, что в половине случаев лейкемические клетки до события имели СК. Это позволяет предположить, что, возможно, имеется достаточная адаптация клеток уже при рецидиве 1 в большинстве случаев, за счет чего происходит снижение прироста количества СК в последующих рецидивах.

Эволюция кариотипа состоит, как и эволюция в целом, из 2 противоположных процессов – прогрессии (накопление аберраций) и регрессии (элиминация). Согласно теории лейкемогенеза, последовательное накопление мутаций и хромосомных аберраций должно приводить к постепенному накоплению генетических изменений, в то время как регрессия чаще обеспечивается только воздействием химиотерапии, в результате которого элиминируется весь клон клеток, содержащий вторичные изменения. Возможна и случайная элиминация фоновых аберраций при делеции клеток, а также вытеснение клеток одного клона более агрессивным клоном клеток. В нашем исследовании были выявлены все варианты эволюционных путей кариотипа: прогрессия, регрессия и их сочетание. Последний вариант может быть результатом изначальной элиминации клона с анализируемыми вторичными аберрациями под действием химиотерапии, после чего происходит накопление новых аберраций в ходе прогрессии рецидивного клона. Однако наиболее часто в анализируемых случаях выявлена клональная прогрессия без сочетания с регрессией (38,2% для пар первичный лейкоз / рецидив и 50% – в парах рецидив/рецидив). Если рассматривать эволюционный вариант КР+КП как результат прогрессии клона-основателя, то частоты еще выше и составляют 67,6% и 61,1% соответственно. Таким образом, несмотря на разнообразие механизмов цитогенетической эволюции лейкемических клонов клеток, в большинстве случаев наблюдается усложнение структуры самого кариотипа.



Однако данные литературы о том, что СК более свойственен пациентам с неблагоприятными группами риска [7], в нашем исследовании не подтверждается для всех неблагоприятных цитогенетических групп. Так, при КМТ2А+ ВП-ОЛЛ в процентном содержании наличие СК при рецидиве выявлялось реже (9,1%, СК ≥ 3 СХА и СК ≥ 1 СХА), чем в группе ВП-ОЛЛ без специфических aberrаций (46,8% СК ≥ 3 СХА, $p=0,021$; 66% СК ≥ 1 СХА, $p=0,0006$). В то время как при BCR::ABL1+ ВП-ОЛЛ частота была выше как при первичной диагностике (42,9%), так и при рецидиве (57,1%), однако не происходило статистически значимого прироста СК, что демонстрирует разное влияние ДХА и их количества на метафазу для развития рецидива в различных генетических вариантах ВП-ОЛЛ.

Помимо изменения структуры кариотипа в пределах одной клетки изучалась и клональная гетерогенность. Анализ субпопуляционного состава на наличие ≥ 2 аномальных родственных клонов показал, что происходит и усложнение клональной архитектуры при рецидиве заболевания (с 19,1% до 41,5%, $p=0,0017$), что согласуется с имеющимися данными литературы [8, 11].

В отличие от большинства исследований, нами была проведена оценка субклональной структуры в разных цитогенетических группах ВП-ОЛЛ, по результатам которой видно, что гетерогенность субклональной структуры возрастает во всех группах, однако с разной частотой. Так, наличие ≥ 2 субклонов при рецидиве реже выявляется при рецидиве КМТ2А+ ВП-ОЛЛ и чаще – при рецидивах BCR::ABL1+ ВП-ОЛЛ. При этом у КМТ2А+ выявлен наименьший прирост случаев (с 9,1% до 36,4%, $p=0,12$), в BCR::ABL1+ ВП-ОЛЛ – с наибольшей частотой (с 14,3% до 71,4%, $p=0,03$). Статистически значимо возрастает и количество субклонов для группы ВП-ОЛЛ без рекуррентных aberrаций (с 14,8% до 40,4%, $p=0,006$). Таким образом, КМТ2А+ ВП-ОЛЛ демонстрируют меньшую сложность не только кариотипа в пределах одной клетки, но и субклональной структуры, что говорит о меньшем влиянии ДХА на патогенез данного варианта лейкоза.

Интересным оказалось и то, что в парах рецидив/рецидив в сравнении с парами первичный лейкоз / рецидив наблюдается уменьшение числа вновь появившихся случаев с СК и ≥ 2 субклонами за счет того, что в исходном клоне уже имелась сложная структура кариотипа (см. рис. 2) или субклональная структура. При этом продолжалась КП с уменьшением количества случаев с КР (см. рис. 1), что указывает на худший результат химиотерапии по подавлению лейкоэмических клеток рецидива. Также можно допустить, что в происходящей КП важную роль играет действие использованных для лечения цитостатических препаратов.

В выполненном исследовании были выявлены случаи со сменой МЧХ при рецидиве, часть из которых стала следствием КЭ исходного лейкоэмического клона, а часть, вероятно, была результатом неэффективного стандартного цитогенетического исследования при первичной диагностике (один случай со скрытой ВГ и один со скрытой гипопloidией). Оба случая были первично диагностированы до 2019 года, когда для диагностики скрытых анеупloidий стал широко использоваться метод FISH, что показывает необходимость использования метода FISH (или определение ДНК-индекса) при первичной диагностике для выявления скрытых, прогностически значимых анеупloidий.

Изучение динамики конкретных цитогенетических изменений, их сочетаний, вариантов сложных кариотипов приведет к лучшему пониманию биологических механизмов, ответственных за терапевтическую резистентность клеточных клонов.

Таким образом, важным является установление дополнительных факторов прогноза рецидива еще на этапе первичной диагностики ОЛЛ с изменением интенсивности терапии или более ранним проведением трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в первой линии терапии пациентов, которым она показана.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение кариотипа происходит с высокой частотой как при первом (83,8%), так и при последующих (72,2%) рецидивах. При этом чаще наблюдается клональная прогрессия (67,8%) с появлением новых хромосомных aberrаций и усложнение кариотипа при рецидиве заболевания за счет как увеличения частоты СК, так и усложнения субклональной структуры.

Увеличение частоты СК ≥ 3 СХА происходит с 27,9% до 45,6% ($p=0,033$) для всех ВП-ОЛЛ, а также наблюдается увеличение субклональной гетерогенности при рецидиве заболевания с 19,1% до 41,5% ($p=0,0017$). Однако величина прироста варьирует в разных генетических группах ВП-ОЛЛ от незначительной при KMT2A+ ВП-ОЛЛ до существенной при ВП-ОЛЛ без рекуррентных aberrаций. А в группе BCR::ABL1+ ВП-ОЛЛ частота СК выявляется наиболее широко и при первичной диагностике (42,9%), и при рецидиве заболевания (57,1%), однако не происходит статистически значимого увеличения случаев с СК ($p>0,1$). При этом BCR::ABL1+ ВП-ОЛЛ демонстрируют наибольшее усложнение субклональной структуры при рецидиве (с 14,3% до 71,4%, $p=0,03$). Для группы ВП-ОЛЛ без рекуррентных aberrаций показано как увеличение частоты СК ≥ 3 СХА (с 27,7% до 46,8%, $p=0,05$), так и количество случаев с ≥ 2 aberrантными субклонами (с 14,8% до 40,4%, $p=0,006$). Кроме того, в этой группе выявлено увеличение частоты gain1q, del6q, del9p, дисбаланс 17p/17q. При этом большинство изменений происходит при первичной диагностике и первом рецидиве, а в последующих рецидивах прирост частоты значимых изменений кариотипа снижается, что говорит о важности выявления минорных субклонов с неблагоприятными цитогенетическими изменениями при первичной диагностике.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Waanders E., Gu Z., Dobson S.M., et al. Mutational landscape and patterns of clonal evolution in relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Discov.* 2020;1(1):96–111. doi: 10.1158/0008-5472.BCD-19-0041
2. Dobson S.M., García-Prat L., Vanner R.J., et al. Relapse-Fated Latent Diagnosis Subclones in Acute B Lineage Leukemia Are Drug Tolerant and Possess Distinct Metabolic Programs. *Cancer Discov.* 2020;10(4):568–587. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1059
3. Anderson K., Lutz C., van Delft F.W., et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature.* 2011;469(7330):356–61. doi: 10.1038/nature09650
4. Ma X., Edmonson M., Yergeau D., et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 2015;6(1):6604. doi: 10.1038/ncomms7604
5. Eckert C., Groeneveld-Krentz S., Kirschner-Schwabe R., et al. ALL-REZ BFM Trial Group. Improving stratification for children with late bone marrow B-cell acute lymphoblastic leukemia relapses with refined response classification and integration of genetics. *J Clin Oncol.* 2019;37(36):3493–3506. doi: 10.1200/JCO.19.01694
6. Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X., et al. Genomic Analysis of the Clonal Origins of Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science.* 2008;322:1377–1380. doi: 10.1126/science.1164266
7. Gindina T.L., Mamaev N.N., Latypova M.V., et al. Complexity of Chromosomal Abnormalities in Patients with Post-Transplant Relapses of Acute Leukemias. *The Bulletin of Hematology.* 2019;15(2):27–28. (In Russ.)
8. Gindina T.L., Mamaev N.N., Nikolaeva E.N., et al. Analysis of Karyotype Aberrations in Children and Adolescents with Post-Transplant Relapses of Acute Leukemias. *Klin. Onkogematol.* 2015;8(4):420–427. (In Russ.)
9. McGowan-Jordan J., Hastings R.J., Moore S. (eds) (2020) *ISCN 2020: An international system for human cytogenomic nomenclature*. Karger.
10. Valochnik A.V., Kapuza D.R., Vshyukova V.S., Shman T.V. Cytogenetic Alterations in Leukemic Cells of Pediatric and Young Adult Patients with Primary B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (Based on the Results of a Long-Term Study of Patients with BCP-ALL of the Republic of Belarus). *Laboratory Diagnostics Eastern Europe.* 2025;14(1):97–109. doi: 10.34883/PL.2025.14.1.008
11. Gindina T.L., Mamaev N.N., Bondarenko S.N., et al. Complex chromosomal aberrations in patients with post-transplantation relapses of acute leukemias: clinical and theoretical aspects. *Clinical Oncohematology.* 2015;8(1):69–77. (In Russ.)

<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.025>



Дикая Т.В.✉, Гольдинберг Б.М., Климович О.В.
6-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Морфология антигена D системы Rh и причины ослабления его фенотипического проявления при беременности: обзор литературы

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Дикая Т.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, редактирование, одобрение финального варианта рукописи; Гольдинберг Б.М. – анализ полученных данных, интерпретация данных, подготовка текста к печати; Климович О.В. – анализ полученных данных, интерпретация данных, подготовка текста к печати.

Подана: 20.06.2025

Принята: 23.10.2025

Контакты: 6gkb-trfz@mcct.by

Резюме

Введение. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению различных характеристик эритроцитов в норме и при патологии, к настоящему времени нет четкого представления о связи ослабления фенотипического проявления на эритроцитах антигена D системы Rh с реактивностью организма матери на развивающийся плод.

Цель. Обобщить имеющиеся в литературе сведения об ослаблении фенотипического проявления антигена D системы Rh во время беременности и сопоставить наблюдения с современными знаниями о закономерностях возникновения морфофункциональных и структурных нарушений эритроцитов крови, обозначить круг проблем и наметить пути их решения.

Материалы и методы. Проведен подбор доступных материалов по морфологии мембраны эритроцита и антигена D системы Rh и причинах ослабления его фенотипического проявления при беременности. В качестве метода исследования применен системный анализ.

Результаты. Проведен анализ причин ослабления фенотипического проявления на эритроцитах антигена D у беременных женщин. Выявлена связь действия эндогенных растворителей жиров инфекционного и гестационного генеза. Совокупность иммуногематологических и молекулярно-генетических технологий позволяет достоверно определить наличие эритроцитарного антигена D во время беременности.

Заключение. Эволюция методов определения антигена D системы Rh насчитывает 80 лет. В этот период времени прослеживается применение пяти методологических подходов: описательного, биохимического, иммуногематологического, молекулярно-биологического и молекулярного моделирования. У беременных женщин, особенно при гестозах и обострении герпетической или цитомегаловирусной инфекций, наблюдаются структурно-функциональные изменения мембраны эритроцитов, что, вероятно, приводит к ослаблению фенотипического проявления антигена D системы Rh. Актуальной задачей службы крови Министерства здравоохранения Республики Беларусь в области иммуногематологии, в том числе акушерской, является

внедрение современных высокочувствительных и специфических иммуногематологических методов определения вариантного антигена D, а также молекулярно-биологического метода выявления мутантного гена RHD.

Ключевые слова: мембрана, антиген D, система Rh, фенотипическое проявление, беременность

Dzikaya T.✉, Gol'dinberg B., Klimovich O.
6th City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Morphology of (Rh) D Antigen and Reasons for its Impaired Phenotypic Expression in Pregnancy: A Literature Review

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Dzikaya T. – study concept and the design, material collection, processing, editing, approval of the final version of the manuscript; Gol'dinberg B. – obtained data analysis and interpretation, text preparation for printing; Klimovich O. – obtained data analysis and interpretation, text preparation for printing.

Submitted: 20.06.2025

Accepted: 23.10.2025

Contacts: 6gkb-trfz@mcct.by

Abstract

Introduction. Despite a great number of studies devoted to investigating various characteristics of red blood cells in normal and pathological conditions, there is currently no clear understanding of the relationship between the weakening of phenotypic expression of (Rh) D antigen in red blood cells and the reactivity of the mother's body to the developing fetus.

Purpose. To summarize data available in literature about weakening of the phenotypic expression of Rh (D) antigen during pregnancy and to compare the observations with modern knowledge about patterns of morphofunctional and structural disorders in red blood cells, to identify the range of issues and to outline ways for their resolving.

Materials and methods. A selection of available literature materials on red blood cell membrane morphology and Rh (D) antigen and reasons for its phenotypic expression weakening in pregnancy was carried out. A system analysis was applied as a research method.

Results. The analysis of the reasons for weakening the phenotypic expression of Rh (D) antigen in red blood cells in pregnant women was carried out. A relationship between the action of endogenous fat solubilizers of infectious and gestational origin was revealed. A combination of immunohematological and molecular genetic technologies allows a reliable detection of red blood cell antigen D in pregnancy.

Conclusion. The evolution of Rh (D) antigen detection methods dates back 80 years. During this time period, five main methodological approaches have been traced: descriptive, biochemical, serological, molecular biological, and molecular modeling. In pregnant women, especially in preeclampsia and exacerbation of herpes or cytomegalovirus infections, structural and functional changes in red blood cell membrane are observed,

which, probably, leads to a weakening of the phenotypic expression of Rh (D) antigen. An urgent task of the Blood Service under the Ministry of Health of the Republic of Belarus in the field of immunohematology, including obstetrical, is implementing modern highly sensitive and specific immunohematological methods for determining variant forms of D antigen, as well as a molecular biological method for detecting the mutant RHD gene.

Keywords: membrane, antigen D, Rh systems, phenotypic manifestation, pregnancy

■ ВВЕДЕНИЕ

Антиген D группы крови человека системы Rh (ранее известный как «резус-фактор») играет важную роль в трансфузионной акушерской и неонатологической клинической практике, так как может вызвать тяжелые гемолитические последствия в результате аллоиммунизации к этому антигену. Антиген D расположен на мембране эритроцитов, представляющих собой самую значительную популяцию (около 84%) от общего клеточного состава организма [1].

Структура мембраны эритроцита представлена тонким липидным бислоем (включающим различные фосфолипиды), периферическими, интегральными белками (оказывают влияние на процессы жизнедеятельности клетки) и цитоскелетом [2]. Взаимосвязь белков и липидов обеспечивает стабильность мембраны эритроцита [3]. Самая большая часть поверхности мембраны принадлежит белкам; это барьер между окружающей средой и цитоплазмой эритроцитов.

В мембрану эритроцита встроены 48 антигенных систем, самой полиморфной из которых является система Rh. Она включает 59 антигенов. Особенность антигена D – его полиморфизм, насчитывающий, по последним данным, 710 аллелей [4]. Согласно многочисленным публикациям, существует тесная двусторонняя связь между состоянием организма и морфофункциональными изменениями эритроцитов [5–9].

Упоминаются случаи ослабления фенотипического проявления антигена D при ряде заболеваний. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных изучению различных характеристик эритроцитов в норме и при патологии, к настоящему времени нет четкого представления о связи ослабления фенотипического проявления антигена D с реактивностью организма матери на развивающийся плод.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обобщить имеющиеся в литературе сведения об ослаблении фенотипического проявления антигена D системы Rh во время беременности и сопоставить наблюдения с современными знаниями о закономерностях возникновения морфофункциональных и структурных нарушений эритроцитов крови, обозначить круг проблем и наметить пути их решения.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен подбор доступных источников литературы по морфологии мембраны эритроцита и антигена D, ослаблению его фенотипического проявления (экспрессии) при беременности. В качестве метода исследования применен системный анализ. Контуры проблемы и пути ее решения, в том числе в историческом плане, сгруппированы в хронологическом порядке.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение причин ослабления фенотипического проявления на мембране эритроцита антигена D, на наш взгляд, следует проследить в контексте с исследованиями физико-химических особенностей мембраны эритроцитов. Фундаментальным изучением нормальных и патологических структур эритроцитов в 1950–1960 годах в коллективе теоретиков (В.Г. Вогралик, В.А. Чепурин, В.С. Лаврова и др.) и клиницистов занимался один из ведущих гематологов страны – профессор Д.И. Гольдберг [10]. Поскольку мембрана эритроцитов представляет собой композитную структуру, основой которой являются белковые и липидные молекулы, проводилось изучение фосфолипидного и жирнокислотного составов, липид-липидных и липид-белковых взаимодействий, микровязкости липидного компонента мембраны, ее белкового спектра. Особое внимание уделялось оценке состояния катионтранспортирующих систем мембраны красных кровяных клеток, поверхностной архитектоники и ультраструктуры при ее коррекции [11].

Первым о существовании слабых вариантов антигена D, обозначенных как Du, сообщил F. Stratton в 1946 году [12].

Термином «Du» называли антиген D на тех эритроцитах, которые не агглютинировались анти-D-антителами класса IgM, но давали положительный результат с антителами анти-D класса IgG в непрямом антиглобулиновом тесте. «Чистых» анти-Du-антител не было выделено: у пациентов с D-отрицательным антигеном после переливания им эритроцитов с антигеном Du вырабатывались антитела со специфичностью анти-D, что доказывало существование только количественных различий между антигенами D и Du.

В результате посемейного обследования F. Stratton (1946), R. Sanger et S. Lawler (1948) пришли к выводу, что антиген Du является аллельным геном на локусе D – d. Было высказано также предположение о возникновении антигена Du в результате мутации или модификации классического антигена D. Ослабление фенотипического проявления на эритроците антигена D также было прослежено на особой комбинации обычных генов системы Rh. Оказалось, что гомозиготный ген RHce действует ингибитором на функцию антигена D (П.Н. Косяков, Л.Н. Муравьева, 1962), который продуцируется геном RHD. R. Ceppellini (1965) заметил, что материнский ген RHcDe в сочетании с отцовским геном RHcde (по-современному – RHce) программирует биосинтез нормального антигена D. Однако в комбинации с отцовским геном RHcde у плода образуется антиген D с пониженными агглютинабельными свойствами, как и у антигена Du. Объяснений этому факту не последовало.

Анализ литературных публикаций свидетельствует о том, что до 1960 года химическая структура антигенов системы Rh оставалась загадкой, поскольку, по нашему мнению, не были задействованы достижения исследований физико-химических особенностей мембраны эритроцитов. Многочисленные попытки выделить антиген D в чистом виде и проверить его серологические свойства специфическими антителами были безуспешными. Высказывалось суждение о том, что этот антиген в серологически активном виде не может существовать вне клеточной мембраны и, будучи выделенным из нее, тотчас инактивируется. Кроме того, поддерживалось мнение о том, что нагревание и высушивание эритроцитов снижают серологическую активность антигенов Rh [13].



Таким образом, обозреваемый период времени (1946–1959) в изучении причин ослабления фенотипического проявления на эритроците антигена D позволяет нам отнести его лишь к описательному.

В 1960-х годах были предложены разработки адекватных методов исследования гидрофобных структур мембраны эритроцитов, которые привели к существенному сдвигу в этой области. Появились сообщения F.A. Green (1967) о том, что экспрессия антигенов D и C на эритроцитах связана с тиоловыми группами и, следовательно, эти антигены по своей природе относятся к белкам, а не к полисахаридам, как считали ранее по аналогии с полисахаридами A и B системы ABO.

Далее F.A. Green (1972) было показано, что липидные фракции, экстрагированные из стромы эритроцитов *n*-бутанолом, а также получаемый при этом нерастворимый белковый осадок не обладают иммуногематологической активностью по отдельности, но при объединении этих фракций специфическая D-активность субстрата вновь проявляется. Таким образом, стала проясняться белково-липидная природа субстанции Rh.

N.C. Hughes-Jones et al. (1975) подтвердили, что основными компонентами, необходимыми для фенотипического проявления антигена D, являются фосфолипиды, поскольку обработка мембран эритроцитов фосфолипазами A2 и C инактивировала антигены D, Cc и Ee. Был установлен важный факт: анти-D-антитела, адсорбированные на эритроцитах D-положительных, предотвращали инактивацию антигена D фосфолипазой A2, что указывало на специфичность воздействия этого фермента именно на структурноноситель антигена D.

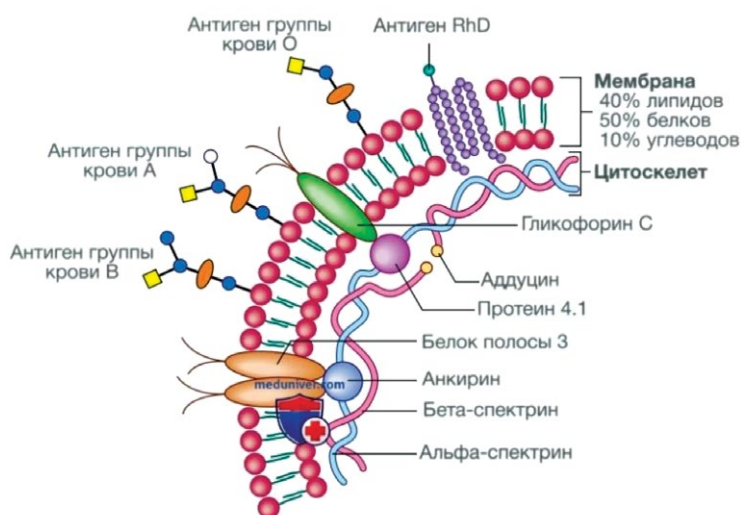


Рис. 1. Основной белковый спектр мембраны эритроцитов (антиген D встроен в анионный транспортный белок полосы 3)

Fig. 1. Main protein spectrum of red blood cell membrane (RhD antigen is embedded in the anionic transport protein of band 3)

Попытки выделить и идентифицировать белок RhD, предпринятые до 1980-х годов, позволили составить общую физико-химическую характеристику антигенов Rh. Предварительно установлено, что белок RhD имеет молекулярную массу 7–10 кДа. Другие исследователи (E.J. Victoria et al.) сообщили, что антигены Rh расположены на анионном транспортном белке в полосе 3 (L.C. Mahan, S.P. Masouredis, 1981). Полоса 3, как теперь известно, соответствует антигенам системы Diego. Впоследствии полученные результаты были объяснены излишним протеолизом полипептидов D при их очистке, а также тем фактом, что оба белка одинаково гидрофобны и мигрируют вместе в процессе выделения из мембраны эритроцитов (рис. 1).

Новая веха в исследовании антигенов системы Rh открылась в начале 1980-х годов, когда появились методы выделения растворимых комплексов «D-анти-D» иммунопреципитацией антигенов специфическими антителами, меченными радиоактивным йодом (S. Moore et al., 1982; K. Ridgwell et al., 1983). Вскоре были идентифицированы полипептиды с молекулярной массой 32–34 кДа, несущие серологическую активность D, Cc и Ee и отсутствовавшие на эритроцитах Rh_{null}. Каждый полипептид содержал экзофациальные тиоловые группы (K. Ridgwell et al., 1983).

Использование глутатионмалеимидмембранных зондов также указывало на причастность экзофациальных тиоловых групп к D-специфичности. Однако значение свободных тиоловых групп в формировании антигенов Rh было поставлено под сомнение K. Suyama et al. (1995).

Прорыв в понимании молекулярных основ системы Rh произошел в начале 1990-х годов, когда были клонированы гены локуса RH – ген RHD и ген RHCE. Так, B.Y. Colin et al. (1991) выяснили, что D-положительные лица имеют два гена: RHD и RHCE, кодирующие выработку Rh-антигенов, а D-отрицательные имеют один ген RHCE [14].

На основании этого открытия P. Tippet et al. (1996) выдвинули концепцию отличия строения D-положительного и D-отрицательного антигенов [15] (рис. 2).

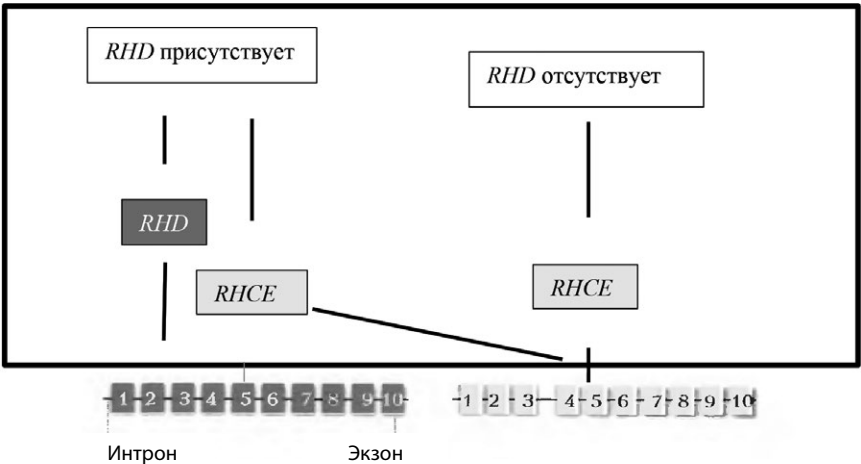


Рис. 2. Схематичное изображение RHD-положительного и RHD-отрицательного генов [15] с упрощенными изменениями
Fig. 2. The schematic representation of the RHD-positive and RHD-negative genes [15] with simplified changes



Классический, или дикий, антиген D относится к семейству негликозилированных трансмембранных полипептидов, имеет сложное строение из 417 аминокислот и 37 составных частей (эпитопов). Характерной особенностью является отсутствие терминальных углеводов [16, 17].

Предположение о том, что полипептиды Rh могут быть связаны в мембране эритроцитов с гликозилированным компонентом (гликопротеин Rh), впервые высказано С.Г. Gahmberg (1983). В конце 1990-х годов был описан гликопротеин RhAG (Rh50), который ассоциирован с D-положительным антигеном [18]. Далее было установлено, что гликопротеин Rh, преципитированный анти-D-антителами вместе с полипептидом Rh, имеет молекулярную массу 45–70 кДа.

В начале 2000-х годов была установлена иммуногематологическая значимость гликопротеина RhAG: при его отсутствии нарушается процесс сборки и переноса из цитоплазмы на мембрану эритроцитов ключевых белков Rh-комплекса – протеинов RhD и RhCE [19].

На рис. 3 схематично изображен комплекс из двух молекул гликопротеина RhAG, протеинов RhD и RhCE на мембране эритроцитов с D-положительным антигеном. Предположительно у лиц с D-отрицательным антигеном такой комплекс содержит две RhCE субъединицы (обычно се) и две RhAG субъединицы [20].

Гликопротеин RhAG на 36% идентичен белкам RhD и RhCE, что указывает на его принадлежность к семейству Rh-протеинов, и он, так же как белки RhD и RhCE, 12 раз пересекает мембрану эритроцитов [21].

При фенотипе Rh_{null} обусловленном мутацией гена RHAG, отсутствуют не только молекулы протеина RhAG, но и протеины RhD и RhCE [22]. При этом лица с геном RHAG могут передавать по наследству антигены семейства Rh своим детям (по аналогии с бомбейским фенотипом по системе ABO). Имеются сведения о наличии у лиц фенотипа Rh_{null} естественных антител ко всем ключевым антигенам системы Rh.

Важно отметить, что у носителей фенотипа Rh_{null} были выявлены морфологические и физиологические изменения эритроцитов [23]. В эритроцитах повышалось осмотическое давление, они приобретали форму сфероцитов, уменьшалась продолжительность их жизни, наступал гемолиз (A.S. Weiner, 1949).

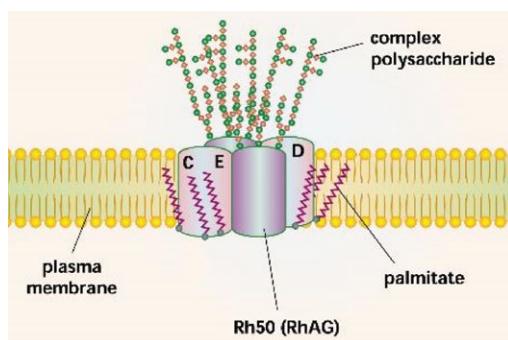


Рис. 3. Комплекс протеина RhD и RhCE с двумя молекулами Rh-ассоциированного гликопротеина – RhAG (Rh50)

Fig. 3. RhD and RhCE protein complex with two molecules of Rh-associated glycoprotein – RhAG (Rh50)

Белки Rh образуют двенадцать трансмембранных спиралей и шесть внеклеточных петель. Только внеклеточные петли 3, 4 и 6 содержат аминокислоты, которые различаются между C и D. Антигенные свойства пептидов могут быть связаны с этими петлями [24].

Современные представления о мембранной топологии антигена D приведены на рис. 4.

Предполагается, что также антигенные свойства зависят от мембранных фосфолипидов, определенным образом ориентирующих полипептидные петли. Антигенная активность полипептидов, как было показано еще ранними исследованиями, утрачивалась при действии растворителей жиров и восстанавливалась при добавлении экзогенного фосфатидилхолина. К частичной утрате антигенных свойств приводит также действие фосфолипазы A2, изменение соотношения мембранного холестерина и фосфолипидов. Эти находки предполагают сильные связи между Rh-антигенами и липидами, хотя биохимический механизм связи остается неясным [13].

Кроме классического антигена D в зависимости от количества антигенных детерминант и эпитопов принято выделять еще 3 основных варианта антигена D: слабый антиген D – D_{weak} (количество антигенных детерминант на эритроците снижено по сравнению с классическим антигеном, возможна выработка анти-D-антител) [25], парциальный антиген D – D_{partial}, у которого отсутствует какой-либо из эпитопов (лица с таким антигеном D могут вырабатывать антитела к отсутствующим у них эпитопам) [26] и антиген D_{el} [27]. Эритроциты с антигеном D_{el} при использовании серологических методов обычно идентифицируют как D-отрицательные; его выявляют, как правило, с помощью методов абсорбции-элюции [28].

Появление новых фенотипов D – D_{weak} обусловлено изменениями нуклеотидных последовательностей или в самом гене RHD, или в его ближайшем окружении. Мутационные процессы чаще происходят в виде замены единичных нуклеотидов и возникают в экзонах (смысловые мутации), что приводит к единичным или множественным заменам аминокислот во внутриклеточной или трансмембранной части белка RhD [12].

К настоящему времени описано 170 типов антигена D_{weak'}, которые обозначают как D_{weak} type 2 ... 170 или по нуклеотидным заменам в гене [29, 30]. Частота встречаемости D_{weak} составляет 0,2–0,5% среди европеоидов и до 2,0% – среди негроидов. Описания в белорусском этносе частоты выявления D-вариантных мы не нашли.

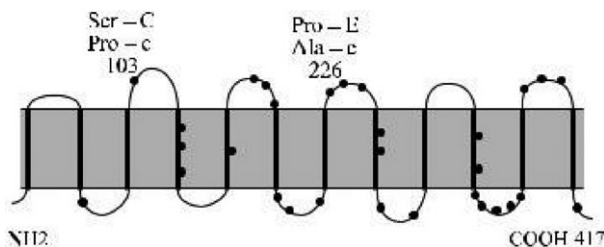


Рис. 4. Модель топологии полипептида антигена D на мембране эритроцита (по P. Agre, J.P. Cartron, 1991)

Fig. 4. Topology model of D antigen polypeptide on the red blood cell membrane (according to P. Agre, J.R. Cartron, 1991)

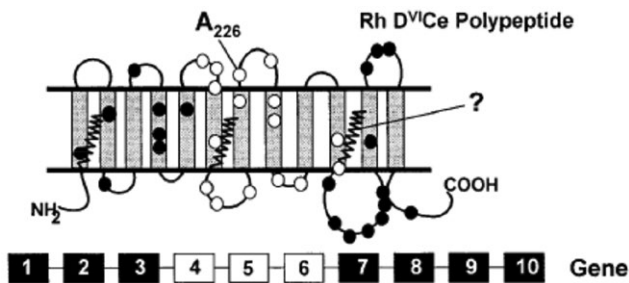


Рис. 5. В результате геной конверсии ряд эпитопов антигена D утрачивается и заменяется на эпитопы других антигенов (экзоны 4, 5 и 6 претерпели качественные изменения)
Fig. 5. As a result of gene conversion, a number of D antigen epitopes are lost and replaced by epitopes of other antigens (exons 4, 5, and 6 have undergone qualitative changes)

Антиген D_{partial} отличается от классического антигена D качественными изменениями в структуре антигена – эпитопах: отсутствием одного или нескольких из известных 36 эпитопов [31] (рис. 5).

При этом количество RhD-протеинов в мембране эритроцитов остается таким же, как у лиц с нормальным антигеном D [32] (см. таблицу).

У реципиентов D_{partial} возможно образование антител против недостающих эпитопов антигена D при переливании им D-положительной крови или во время беременности [33]. В связи с этим реципиенты и беременные женщины с фенотипом D_{partial} считаются D-отрицательными, а доноры – D-положительными.

Эти наблюдения, а также множество специальных исследований убеждают в том, что семейство Rh-протеинов является существенной составляющей цитоскелета эритроцитов и участвует в транспорте воды и аммония через его мембрану [34–36].

Мутация объясняется вероятным во время мейоза обменом ДНК между генами RHD и RHCE, расположенными на одной хромосоме. В результате в гибридном гене RHD утраченная часть замещается CE-пептидной последовательностью. Наиболее часто встречается фенотип DVI антигена D_{partial} (0,01–0,1% у европеоидов и 1,0–1,7% у негроидов) [26, 37]. В Беларуси частота его встречаемости не изучена.

Кластер фенотипов и вовлеченные внеклеточные петли
Cluster of phenotypes and extracellular loops involved

Phenotype cluster	Extracellular			No. of known alleles	Examples
D ^{III}	3	4	6	2	D ^{IIIb} , D ^{IIIc}
DFR	+	+	+	2	DFR type I
D ^{V*}	–	+	+	>5	D ^{Va} type I
D ^{IVb} -like	+	–	+	4	D ^{IV} type III
D ^{VI}	+	+	–	4	D ^{VI} type III
DBT	–	–	+	2	DBT-1
R ₀ ^{Har}	+	–	–	1	R ₀ ^{Har}
D negative	–	+	–	>5	Cde ^S

* Additional major heterogeneity has been observed and is based on the an Ala/Pro polymorphism at codon 226 (4).

В последнее время D_{weak} и D_{partial} нередко обозначаются общим термином – варианты антигены [38].

Эритроциты с антигеном D_{el} при использовании иммуногематологических методов обычно идентифицируют как D-отрицательные; из-за исключительно низкой экспрессии антигена D его выявляют, как правило, с помощью методов адсорбции-элюции. У носителей этого антигена возможен синтез анти-D-антител. Фенотип D_{el} широко распространен у азиатских этносов. В Китае и Японии он составляет до 17% от числа D-отрицательных лиц, выявленных иммуногематологическими методами (абсорбции-элюции) [39]. У европейцев встречается очень редко. В Беларуси случаи выявления D_{el} не описаны.

Накопленные к настоящему времени фактические данные позволяют утверждать, что эритроциты не только вовлекаются в патологический процесс при гематологических заболеваниях, но и могут претерпевать серьезные изменения в структуре и функции при патологии иного генеза: сахарном диабете, приобретенных пороках сердца, злокачественных новообразованиях, шизофрении и других (М.В. Колосова и др., 2001; Е.А. Степовая и др., 2003; В.В. Новицкий и др., 2004).

Известно, что из всех клеток крови наиболее чувствительными к окислительному стрессу являются эритроциты, морфофункциональные характеристики которых могут стать одними из критериев оценки интенсивности свободнорадикальных процессов. Поскольку предполагаются сильные связи между антигенами системы Rh и липидами, то изменение липидной структуры мембранной оболочки эритроцитов может привести к ослаблению достоверного определения антигена D [13].

Имеющиеся в литературе сведения о содержании отдельных фосфолипидных фракций в крови как пациенток с осложнениями течения беременности, так и женщин при физиологически протекающей беременности носят разноречивый характер (В.М. Сидельникова, Г.Т. Сухих, 2011; G. Perrone et al., 2012; C.J. Kim et al., 2015; А.В. Ширковец, Ю.И. Ишпахтин, Л.С. Матюшкина, 2017). Это связано с тем, что содержание фосфолипидов в организме как беременных, так и небеременных женщин значительно колеблется в зависимости от климатических условий, а также из-за проведения исследований разными методами.

Так, А.В. Ширковец и др. (2017) изучили содержание циклических нуклеотидов и фосфолипидов в крови 130 беременных женщин при угрожающих преждевременных родах (основная группа) и 50 женщин с физиологическим течением беременности. Концентрация аденозин-3,5-монофосфата и циклического гуанозин-3,5-монофосфата, а также их соотношение в сыворотке крови у обследованных основной группы достоверно снижались во II и в III триместрах беременности. При исследовании содержания фосфолипидов установлено, что уровень фосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилсерина достоверно увеличивался, а содержание лизофосфатидилхолина уменьшалось во II триместре беременности по сравнению с показателями контрольной группы. В III триместре беременности достоверно уменьшилось содержание фосфатидилэтаноламина по сравнению с таким же показателем в контрольной группе.

Н.А. Ишутина и др. (2013) на протяжении ряда лет изучали проблему вирусной инфекции простого герпеса и цитомегаловирусной инфекции (ЦМВИ) во время беременности. Было установлено, что обострение герпес-вирусной инфекции (ГВИ) в период гестации приводит к интенсификации процессов перекисного окисления

липидов (ПОЛ), увеличению активности провоспалительного фермента фосфолипазы A2, способствует гидролизу мембранных фосфолипидов с образованием токсических продуктов лизофосфатидилхолина и арахидоновой кислоты. Дестабилизация биологических процессов при герпес-вирусной инфекции происходит при накоплении в организме вторичных продуктов ПОЛ, обладающих токсическим действием, основным из которых является малоновый диальдегид (МДА). По содержанию данного метаболита в плазме судят о выраженности ПОЛ в организме, особенно при возникновении в нем деструктивных процессов, определяя таким образом степень выраженности патологических реакций, что становится причиной нарушения структурно-функционального состояния эритроцитов периферической крови беременных. Выявленные изменения наиболее выражены при титре антител IgG к ВПГ-1 1 : 12 800.

Европейским региональным бюро ВОЗ цитомегалия включена в группу «новых и таинственных» инфекций. Сущность проблемы ЦМВИ в том, что она относится к так называемым оппортунистическим инфекциям, клиническое проявление которых возможно лишь в условиях первичного или вторичного иммунодефицита. У лиц с нормально функционирующей иммунной системой в подавляющем большинстве случаев инфекция протекает по типу вирусоносительства. В среднем у 90–95% взрослого населения обнаруживают антитела к ЦМВИ. Распространенность цитомегаловирусной инфекции, возможность длительной персистенции возбудителя в организме человека с поражением различных органов и систем, трудности лабораторной диагностики, отсутствие надежных лечебных и профилактических средств убедительно подчеркивают актуальность данной инфекции, особенно при ее обострении во время беременности (В.А. Исаков и др., 2006; N. Bonaros et al., 2008; А.К. Полукчи и др., 2009; Н.А. Ишутина и др., 2020).

В качестве универсального неспецифического механизма при всех клинко-патологических проявлениях гестоза может рассматриваться окислительный стресс, возникающий при нарушении равновесия между прооксидантами и компонентами системы антиоксидантной защиты. Активация процессов свободнорадикального окисления повреждает и повышает проницаемость сосудистых, клеточных мембран и мембран внутриклеточных органелл, приводит к дисфункции внутриклеточных метаболических процессов, способствует развитию и прогрессированию полиорганной недостаточности. Показано, что важная роль в повреждении структурно-функциональных свойств клеточных мембран при гестозе принадлежит накоплению продуктов ПОЛ, обладающих выраженной цитотоксичностью (Н.М. Козлова и др., 2010; Т.Н. Мирошниченко и др., 2013; I.N. Turenkov et al., 2013; А.С. Pereira, 2014).

По мере повышения степени тяжести гестоза у беременных женщин происходит интенсификация ПОЛ, коррелирующая с уменьшением концентрации сульфгидрильных групп низкомолекулярных соединений и белков крови. Причем если при гестозе средней степени тяжести изменения параметров, указывающих на интенсификацию свободнорадикальных процессов, происходят в основном в плазме, то при тяжелом течении гестоза они затрагивают и эритроциты. Результаты исследования демонстрируют тот факт, что при гестозе низкомолекулярная тиодисульфидная система крови беременных более чутко реагирует на патологические изменения эндотелия сосудов, поскольку именно она является одной из первых «ловушек» свободных радикалов [40, 41].

О.М. Безмельцевой (2016), О.М. Безмельцевой, В.И. Циркиным и др. (2017) было изучено влияние серотонина на агглютинабельность эритроцитов беременных женщин и рожениц, индуцированную моноклональными анти-D IgM антителами. Для окситоцина характерно повышение агглютинабельности эритроцитов в I и III триместрах беременности, а для серотонина – снижение времени начала агглютинации в I и III триместрах и у рожениц, не влияя при этом на беременных II триместра и женщин с угрозой преждевременных родов [42, 43].

Ряд работ посвящен повышению скорости агглютинации эритроцитов под влиянием адреналина у женщин на различных этапах репродуктивного процесса [44]. Данные, полученные при использовании разных методов определения функционального состояния адренорецепторов мембраны эритроцитов, вносят новые представления о физиологии эритроцитов, о роли α - и β -адренорецепторов в изменении агрегационной способности, об особенностях адренореактивности организма и функциональных свойств эритроцитов в норме и при различной патологии. Активация альфа-адренорецепторов повышает активность фосфолипазы A2, кальмодулина и вход Ca^{2+} .

При угрозе прерывания беременности меняется эффективность активации адренорецепторов эритроцитов: для β -адренорецепторов она снижается, а для α -адренорецепторов AP и β_1 -адренорецепторов – возрастает [45].

С.С. Осадчук и др. (2013) исследовали влияние анемии на состав и физико-химические свойства мембран эритроцитов беременных женщин. Дисперсионный анализ показал, что степень влияния анемии на содержание общих фосфолипидов составила 11,1%, а на отношение фосфолипидов и холестерина – 23,9%.

Самыми эффективными иммуногематологическими методами выявления антигенов D_{weak} являются те, что основаны на непрямом антиглобулиновом тесте, выполняемом методом колоночной агглютинации. Однако и эти методы не позволяют идентифицировать некоторые типы слабого D, например, варианты D_{weak} type 15 [46].

В настоящее время в иммуногематологической практике нет методов и реактивов, которые обеспечивали бы определение всех без исключения вариантных форм D-антигена. Молекулярно-биологические исследования решают эту проблему. Трудность в исследовании молекулярного механизма Rh-группы крови заключается не только в анализе последовательности, но и в выявлении рекомбинации RHD-CE и изменении числа копий гена RHD [47]. Однако в этой области доступно несколько точных методов выявления. Количество копий гена RHD напрямую влияет на экспрессию его поверхностного антигена, что имеет большое значение для пренатальной диагностики и профилактики гемолитической болезни плода и новорожденного [48]. Следовательно, определение количества копий гена RHD имеет решающее значение. В настоящее время анализ мультиплексной ПЦР (MLPA) и гибридизационный боксовый тест являются относительно подходящими методами для выявления гетерозиготности.

С точки зрения выявления точечных мутаций анализ MLPA менее эффективен, чем ПЦР-SBT, особенно для слабых вариантов D-антигена. Он не может обнаружить большинство сайтов редких мутаций, и с его использованием еще сложнее обнаружить новые мутации, потому что он содержит всего несколько хорошо зарекомендовавших себя сайтов мутаций. С другой стороны, метод ПЦР-SBT не может определить вариацию числа копий гена RHD, а гибридизационный тест PCR-SSP box имеет относительно высокую частоту ошибок [49].

Методы молекулярного моделирования потенциально могут предоставить новую и более точную информацию о структуре изменения резус-белка (Burton and Daniels, 2011; de Brevern et al., 2018; Floch et al., 2021), что крайне важно для лучшего понимания фенотипического проявления Rh-антигенов и образования антител в трансфузионной медицине. Первые два основных вопроса, на которые можно было бы ответить с помощью молекулярных моделей, – это трехмерная структура мономеров D-антигена, а также структура и стабильность тримеров RhD/RhAG различного состава [50]. Структура мономера может быть смоделирована с помощью гомологии, то есть сопоставления белковой последовательности со структурой разрешенного белкового гомолога, используемого в качестве матрицы. Состав и стабильность тримеров – более сложные вопросы, которые могут быть решены с помощью моделирования молекулярной динамики для воспроизведения движения белков на атомистическом уровне.

В первые годы XXI столетия с помощью гомологического моделирования было предложено несколько трехмерных моделей для изучения Rh-белков. Эти предположения были основаны на бактериальных гомологах и/или на методах автоматизированного моделирования (S. Khademi et al., 2004; M.J. Conroy et al., 2005; I. Callebaut et al., 2006; D. Lupo et al., 2007; W.A. Flegel et al., 2008; L. Tilley et al., 2010; G.M. Silva et al., 2012). С 2018 года подходы к глубокому обучению оказали значительное влияние на разработку 3D-моделей белков, основанную на rhCG человека и NeRh50 в качестве шаблонов (de Brevern et al., 2018; Jumper et al., 2021), а затем модель тримера RhD-RhAG (Floch et al., 2021) и модели RhAG3 и RhAG2RhD, а также AlphaFold2.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция методов определения антигена D системы Rh насчитывает 80 лет. В этот период времени прослеживается применение пяти методологических подходов: описательного, биохимического, иммуногематологического, молекулярно-биологического и молекулярного моделирования.

У беременных женщин, особенно при гестозах и обострении герпетической или цитомегаловирусной инфекций, наблюдаются структурно-функциональные изменения мембраны эритроцитов, что, вероятно, приводит к ослаблению фенотипического проявления антигена D системы Rh.

Актуальной задачей службы крови Министерства здравоохранения Республики Беларусь в области иммуногематологии, в том числе акушерской, является внедрение современных высокочувствительных и специфических иммуногематологических методов определения вариантного антигена D, а также молекулярно-биологического метода выявления мутантного гена RHD.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sender R., Fuchs S., Milo R. Revised Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
2. Kim Y., Park J., Kim M. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood research.* 2017;52(2):84–94. doi: 10.5045/br.2017.52.2.84
3. Babushkina I., Pivovarov Y., Kurilskaya T. et al. Protein assay of the red-cell membrane and its changes in the case of pathology. *Journal of Membrane and Cell Biology.* 2015;32(3):168–178. doi: 10.7868/S0233475515030020 (in Russian)
4. Floch A., Galochkina T., Pirenne F. et al. Molecular dynamics of the human RhD and RhAG blood group proteins. *Front. Chem.* 2024;12:1360392. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1360392>

5. De Palma A., Roveri A.J., Zaccarin M. et al. Extraction methods of red blood cell membrane proteins for Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) analysis. *J Chromatogr A*. 2010;1217(33):5328–36. doi: 10.1016/j.chroma.2010.06.045
6. Judkins A.J., Christensen R.D., Baer V.L. et al. Neonates with suspected microangiopathic disorders: performance of standard manual schistocyte enumeration vs the automated fragmented red cell count. *J Perinatol*. 2019;39:1555–1561. doi: 10.1038/s41372-019-0482-y
7. Gwozdziński K., Pieniżek A., Gwozdziński L. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;10:1–19. doi: 10.1155/2021/6639199
8. Strijkova-Kenderova V., Todinova S., Andreeva T. et al. Morphometry and stiffness of red blood cells – signatures of neurodegenerative diseases and aging. *Strijkova-Kenderova, Int. J. Mol. Sci.* 2021;23(1):227. doi: 10.3390/ijms23010227
9. Bujak-Pietrek S., Pieniżek A., Gwozdziński K. et al. The Effect of Piperidine Nitroxides on the Properties of Metalloproteins in Human Red Blood Cells. *Molecules*. 2023;28(16):61–74. doi: 10.3390/molecules28166174
10. Novitsky V., Goldberg E., Urazovoy O. (eds) *Pathophysiology*. In 2 volumes. Volume 2 [Electronic resource]: textbook. 4th ed., revised and additional. M.: GEOTAR-Media, 2015. Available at: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970435205.html> (in Russian)
11. Novitsky V., Ryazantseva N., Stepovaya Ye. et al. Molecular disturbances of erythrocytes membrane during pathology of different genesis are the typical reaction of the organism: contours of the problem. *Bulletin of Siberian medicine*. 2006;2:62–8. doi: 10.20538/1682-0363-2006-2-62-69 (in Russian)
12. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999;93(1):385–93. doi: 10.1182/BLOOD.V93.I1.385.401K19_385_393
13. Donskov S., Morokov S. *Human blood groups*. Moscow: BINOM Publishing House, 2014:1016 p. (in Russian)
14. Colin Y., Cherif-Zahar B., Le Van Kim C. et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 1991;78(10):2747–52. doi: 10.1182/BLOOD.V78.I10.2747.BLOODJOURNAL78102747
15. Tippet P., Lomas-Francis C., Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang*. 1996;70(3):123–31. doi: 10.1111/j.1423-0410.1996.tb01309.x
16. Scott M. Section 1A. Rh serology. Coordinators report. *Transfus. Clin. Biol*. 2002;9(1):23–9. doi: 10.1016/s1246-7820(01)00211-7
17. Conroy M., Bullough P., Merrick M. et al. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. *Br J Haematol*. 2005;131(4):543–51. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05786.x
18. Huang C.H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Current Opinion in Hematology*. 1997;4(2):94–103. doi: 10.1097/00062752-199704020-00004
19. Nicolas V., Le Van Kim C., Gane P. et al. Rh-RHAG/ankyrin-R, a new interaction site between the membrane bilayer and the red cell skeleton, is impaired by Rh(null)-associated mutation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):25526–33. doi: 10.1074/jbc.M302816200
20. Westhoff C.M., Ferreri-Jacobia M., Mak D. et al. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(15):12499–502. doi: 10.1074/jbc.C200060200
21. Matassi G., Cherif-Zahar B., Pesole G. The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *Journal Molecular Evolution*. 1999;48:151–9.
22. Huang C.H., Liu Z., Cheng G.J. Rh50 glycoprotein gene and Rhnull disease: a silent splice donor is trans to a Gly279>Glu missense mutation in the conserved transmembrane segment. *Blood*. 1998;92(5):1776–1784.
23. Huang C.H., Chen Y., Reid M.E. Rhnull disease: the amorph type results from a novel double mutation in RhCe gene on D-negative background. *Blood*. 1998;92(2):64–71.
24. Shautskova L., Shogenov Z. Blood group system Rh (Rhesus): analytical review of modern problems of science and education. 2015;2-1. Available at: <https://science-education.ru/article/view?id=17157> (accessed 09.06.2024). (in Russian)
25. Agre P.C., Davies D.M., Issitt P.D. et al. A proposal to standardize terminology for weak D antigen. *Transfusion*. 1992;32:86–7. doi: 10.1046/j.1537-2995.1992.32192116441.x
26. Tippet P., Sanger R. Further observations of subdivisions of the Rh antigen D. *Arztl. Lab*. 1977;23:476–80.
27. Daniels G. Variants of RhD – current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*. 2013;161:461–70.
28. Shao C.P., Maas J.H., Su Y.Q. et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*. 2002;83(2):156–61. doi: 10.1046/j.1423-0410.2002.00192.x
29. Wagner F.F., Gassner C., Muller T.H. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999;93(1):385–93.
30. Golovkina L., Kalandarov R. RHD and RHCE genes polymorphism: literature review. *Oncohematology*. 2020;15(4):38–51. (in Russian) doi: 10.17650/1818-8346-2020-15-4-38-51
31. Avent N.D., Finning K.M., Liu W. Molecular biology of partial D phenotypes. *Transfusion Clinique et Biologique*. 1996;3(6):511–16. doi: 10.1016/s1246-7820(96)80073-5
32. Flegel W.A., Wagner F.F. Molecular Biology of partial D and weak D: Implications for Blood Bank Practice. *Clin. Lab*. 2002;48(1–2):53–9.
33. Wagner F.F., Eicher N.J., Jorgensen J.R. et al. DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood*. 2002;100(6):2253–6. doi: 10.1182/blood-2002-03-0742
34. Biver S., Scohy S., Szpirer J. et al. Physiological role of the putative ammonium transporter RhCG in the mouse. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2006;13(1–2):167–8. doi: 10.1016/j.traccli.2006.03.003
35. Kustu S., Inwood W. Biological gas channels for NH₃ and CO₂: evidence that Rh (rhesus) proteins are CO₂ channels. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2006;13(1–2):103–10. doi: 10.1016/j.traccli.2006.03.001
36. Mak D., Dang B., Weiner I. et al. Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins RhBG and RhCG. *American Journal Physiology Renal Physiology*. 2006;290(2):F297–305. doi: 10.1152/ajprenal.00147.2005
37. Chou S.T., Westhoff C.M. The Rh system: Roback JD, ed. Technical Manual. Bethesda (MD). *American Association of Blood Banks*. 2011;389–410.
38. Mineeva N. *Human blood groups. Fundamentals of immunohematology* St. Petersburg: Publishing house polygraphic complex "Gangut", 2020;360 p. (in Russian)
39. Yin Q., Flegel W.A. DEL in China: the D antigen among serologic RhD-negative individuals. *J Trans. Med*. 2021;19(1):439. doi: 10.1186/s12967-021-03116-6
40. Shevelkova A., Aylamazyan E., Evsyukova I. Features of oxidative modification of proteins and erythrocyte functional state in pregnancy complicated by placental insufficiency. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2015;64(5):62–8. (in Russian)
41. Khalilov R., Ozhafarova A., Astaeva M. Prooxidant-antioxidant status and morphofunctional characteristics of erythrocytes in the blood of pregnant women with gestosis of various severity. *Modern problems of science and education*. 2015;5. Available at: <https://science-education.ru/article/view?id=22647> (accessed 14.06.2024). (in Russian)

42. Bezmeltseva O. The influence of serotonin and oxytocin on the rate of erythrocyte agglutination in women at different stages of the reproductive process. *Scientific and methodological electronic journal "Concept"*. 2016;11:1841–5. Available at: <http://e-koncept.ru/2016/86395.htm> (in Russian)
43. Tsirkin V., Anisimov A., Dmitrieva S. et al. Prospects for studying lectin-induced erythrocyte agglutination for the diagnosis of premature birth. *Scientific Review. Medical Sciences*. 2017;1:83–104. (in Russian)
44. Tsirkin V., Maryina A. et al. Adrenaline-modulated time of human erythrocyte agglutination depending on the agglutination inductor, gender and stage of the reproductive process in women. *Vestnik of Northern (Arctic) Federal University. Series "Medical and biological sciences"*. 2014;2:78–90. (in Russian)
45. Sundahl N., Bridelance J., Libert C. et al. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther*. 2015;152:28–41. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.001
46. Golovkina L., Stremoukhova A., Pushkina T. et al. Molecular serological characteristics of weak D antigen types of the Rhesus system. *Therapeutic Archive*. 2016;88(7):78–83. doi: 10.17116/terarkh201688778-83
47. Haer-Wigman L., Veldhuisen B., Jonkers R., et al. RHD and RHCE Variant and Zygosity Genotyping via Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Transfusion*. 2013;53:1559–74. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03919.x
48. Pirelli K.J., Pietz B.C., Johnson S.T., Pinder H.L., Bellissimo D.B. Molecular Determination of RHD Zygosity: Predicting Risk of Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Related to Anti-D. *Prenat Diagn*. 2010;30(12–13):1207–12. doi: 10.1002/pd.2652
49. Ying Y., Zhang J., Hong X. et al. The Significance of RHD Genotyping and Characteristic Analysis in Chinese RhD Variant Individuals. *Front Immunol*. 2021;12:755–61. doi: 10.3389/fimmu.2021.755661
50. Bujak-Pietrek S., Pieniążek A. et al. The Effect of Piperidine Nitroxides on the Properties of Metalloproteins in Human Red Blood Cells. *Molecules*. 2023;28(16):61–74. doi: 10.3390/molecules28166174



Скоповец Е.Я.✉, Полякова Е.А., Гурьянова И.Е., Володащик Т.П., Сакович И.С.,
Белевцев М.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Технология ПЦР-анализа в режиме реального времени для выявления мутации основателя в гене NBS1 как причины формирования синдрома Ниймеген

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала, обработка, написание текста – Скоповец Е.Я.; редактирование, обработка, написание текста – Полякова Е.А., Гурьянова И.Е.; сбор материала, редактирование – Володащик Т.П.; редактирование – Сакович И.С., Белевцев М.В.

Подана: 10.06.2025

Принята: 24.10.2025

Контакты: skopovets@yandex.by

Резюме

Введение. Синдром Ниймеген – аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к врожденным нарушениям иммунитета, характеризующееся микроцефалией, иммунодефицитом, нарушением репарации ДНК, что приводит к высокой чувствительности к ионизирующему излучению и повышенному риску злокачественных новообразований. Постановка диагноза синдрома Ниймеген проводится на основе сочетания клинических признаков, результатов иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования, включая определение количества копий эксцизионных колец ДНК TREC/KREC, а также метода секвенирования по Сэнгеру. Однако метод секвенирования характеризуется высокой стоимостью проведения исследования, что влечет за собой необходимость в разработке альтернативного метода диагностики на основе ПЦР.

Цель. Разработать технологию ПЦР в режиме реального времени для выявления гомозиготных и гетерозиготных мутаций основателя в гене NBS1 для повышения уровня диагностики синдрома Ниймеген.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с гомозиготной мутацией в гене NBS1 (N=8), гетерозиготные носители (N=6), здоровые лица (N=10). Разработка ПЦР-технологии для определения наличия альтернативного варианта с.657_661del5 проводилась с использованием реагентов для ПЦР «ArtMix Color ДНК-полимераза» (АртБиоТех, Беларусь) на термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Наличие альтернативного варианта в 6-м экзоне гена NBS1 дополнительно подтверждалось капиллярным секвенированием по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3130, Hitachi (Япония). Полученные в ходе секвенирования данные анализировались при помощи специализированного программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 и BioEdit.

Результаты. В 2025 году в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии технология выявления гомозиготной и гетерозиготной мутации в 6-м экзоне гена NBS1 с использованием ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления



была проведена у 8 пациентов с гомозиготной мутацией, у 6 гетерозиготных носителей и у 10 здоровых детей. Гомо- и гетерозиготные образцы идентифицируются по различиям в форме кривой плавления. В ситуации, когда в целевой последовательности присутствует гомозиготная делеция, детектируемая как один результирующий пик плавления продукта ПЦР слева при температуре 73,2 °С, при отсутствии генетического нарушения будет детектироваться один пик справа при 76,2 °С, при наличии гетерозиготной делеции – два пика: первый (мутантный) слева при температуре 73,2 °С, второй (дикий тип) справа при температуре 76,2 °С.

Заключение. Разработана технология ПЦР в режиме реального времени для выявления гомо- и гетерозиготных мутаций основателя в гене NBS1 для улучшения качества диагностики синдрома Ниймеген. Разработанная методика позволяет определить как гомозиготную делецию в гене NBS1 657del5, которая ассоциирована с синдромом Ниймеген, так и гетерозиготное носительство у родственников пациентов с целью определения предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

Ключевые слова: синдром Ниймеген, NBS1, ПЦР, ДНК, секвенирование

Skapavets K.✉, Polyakova E., Guryanova I., Volodashchik T., Sakovich I., Belevtsev M.
Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Real-Time PCR Technology for Identifying the Founder Mutation in the NBS1 Gene as the Cause of Nijmegen Syndrome

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, editing, material collection, processing, text writing – Skapavets K.; editing, processing, text writing – Polyakova E., Guryanova I.; material collection, editing – Volodashchik T.; editing – Sakovich I., Belevtsev M.

Submitted: 10.06.2025

Accepted: 24.10.2025

Contacts: skopovets@yandex.by

Abstract

Introduction. Nijmegen syndrome is an autosomal recessive disorder classified as a congenital immune disorder (CI) characterized by microcephaly, immunodeficiency, and DNA repair deficiency, which lead to high sensitivity to ionizing radiation and an increased risk of malignant neoplasms. The diagnosis of Nijmegen syndrome is based on a combination of clinical signs, results of immunological and molecular genetic research methods, including determination of the number of TREC/KREC excision rings, as well as the Sanger sequencing method. However, this research method is characterized by a high cost of research, thus requiring an alternative PCR-based diagnostic method to be elaborated.

Purpose. To elaborate a real-time PCR technique for detecting homozygous and heterozygous founder mutations in the NBS1 gene to improve the diagnosis of Nijmegen syndrome.

Materials and methods. The study included 8 patients with homozygous mutation in the NBS1 gene, 6 heterozygous carriers, and 10 healthy individuals. PCR technique for detecting the presence of the alternative variant c.657_661del5 was elaborated using ArtMix Color DNA polymerase PCR reagents (ArtBioTech, Belarus) on a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, USA). The presence of an alternative variant in exon 6 of the NBS1 gene was further confirmed by capillary Sanger sequencing using an ABI 3130 genetic analyzer, Hitachi (Japan). The data obtained during sequencing were analyzed using specialized software "Sequencing Analysis 5.2" and "BioEdit".

Results. In 2025, at the Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, the technique for detecting homozygous and heterozygous mutations in exon 6 of the NBS1 gene using real-time PCR with analysis of melting curves was performed in 8 patients with homozygous mutation, 6 heterozygous carriers, and 10 healthy children. Homozygous and heterozygous samples are identified by differences in the shape of the melting curve. When a homozygous deletion is present in the target sequence, it is detected as one resulting melting peak of the PCR product on the left at the temperature of 73.2 °C; in the absence of a genetic disorder, one peak on the right at 76.2 °C will be detected; in the presence of a heterozygous deletion, two peaks are detected: the first (mutant) one on the left at a temperature of 73.2 °C, and the second (wild type) one on the right at the temperature of 76.2 °C.

Conclusion. We elaborated a real-time PCR technique to detect homozygous and heterozygous founder mutations in the NBS1 gene to improve the quality of Nijmegen syndrome diagnostics. The methodology elaborated allows determining both homozygous deletion in the NBS1 657del5 gene, which is associated with Nijmegen syndrome, and heterozygous carriage in patients' relatives in order to determine the predisposition to oncological diseases.

Keywords: Nijmegen syndrome, NBS1, PCR, DNA, sequencing

■ ВВЕДЕНИЕ

Синдром Ниймеген – аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к врожденным нарушениям иммунитета, характеризующееся микроцефалией, иммунодефицитом, нарушением репарации ДНК, что приводит к высокой чувствительности к ионизирующему излучению и повышенному риску злокачественных новообразований [1, 2]. Большинство пациентов с синдромом Ниймеген, являвшихся гомозиготными носителями «славянского» патогенного варианта (c.657_661del5), происходят из Центральной и Восточной Европы [3].

Злокачественность – проявление NBS1 и иногда бывает симптомом гетерозиготных носителей патогенного варианта гена NBS1 [4]. Ген NBS1 кодирует белок нибрин, который является частью комплекса NBN/Mre11/Rad50 и, взаимодействуя с киназой ATM, останавливает клеточный цикл с репарацией ДНК. Двухцепочечные разрывы ДНК могут возникать во время нормальных процессов репликации и в результате воздействия повреждающих агентов на ДНК [5].

У пациентов с NBS1 неэффективная репарация разрывов ДНК происходит при отсутствии нибрина, что нарушает процессы рекомбинации V(D)J при дифференцировке лимфоцитов [6]. Нарушение пролиферации и дифференцировки лимфоцитов приводит к уменьшению их количества, образованию антигенраспознающих доменов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора.



Постановка диагноза синдрома Ниймеген проводится на основе сочетания клинических признаков, результатов иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования, включая определение количества эксцизионных колец TREC/KREC, а также метода секвенирования по Сэнгеру. Однако метод секвенирования по Сэнгеру характеризуется высокой стоимостью проведения исследования, что влечет за собой необходимость в разработке альтернативного метода диагностики на основе ПЦР.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать технологию ПЦР в режиме реального времени для выявления гомозиготных и гетерозиготных мутаций основателя в гене NBS1 для повышения уровня диагностики синдрома Ниймеген.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данное исследование одобрено этическим комитетом ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии». Было получено письменное информированное согласие от всех участников или их родителей на сбор и анализ образцов крови для проведения исследования.

Подготовка биологического материала. Выделение ДНК

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования использовалась периферическая кровь с антикоагулянтом K2 ЭДТА. Кровь подвергалась первичной обработке для лизиса эритроцитов и получения цельной суспензии лейкоцитов. Из полученной суспензии клеток методом фенол-хлороформной экстракции выделялась ДНК.

Определение мутации по Сэнгеру

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовалась геномная ДНК. Праймеры для ПЦР подбирались таким образом, чтобы их длина составляла 18–22 нуклеотидов, температура отжига находилась в диапазоне 55–65 °С, содержание GC-пар составляло не более 70%, на 3'-конце отсутствовали стабильные петли, праймеры были не способны формировать праймер-димеры со вторым праймером, отсутствовали кластеры повторяющихся нуклеотидов, а также отсутствовали альтернативные сайты отжига прямого и обратного праймеров на ДНК человека в пределах одной хромосомы. Полученные в ходе ПЦР ампликоны проверялись на наличие специфического продукта при помощи горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Секвенирование образцов по Сэнгеру проводилось на генетическом анализаторе ABI 3130, Hitachi (Япония). Полученные в ходе секвенирования данные анализировались при помощи специализированного программного обеспечения Sequencing Analysis 5.2 и BioEdit. При этом полученные по результатам секвенирования нуклеотидные последовательности пациента сравнивались с референсными.

Определение мутации методом ПЦР в режиме реального времени с использованием кривых плавления

Подбор специфических праймеров проводился с помощью программного обеспечения Primer-BLAST [7, 8]. Праймеры для ПЦР в режиме реального времени

подбирались таким образом, чтобы их длина составляла 20–25 нуклеотидов, температура отжига находилась в диапазоне 55–65 °С, а размер ампликона составлял около 100 нуклеотидных пар. Прогнозирование флуоресцентных кривых плавления продуктов ПЦР мутантного и дикого типа осуществлялось с помощью веб-приложения uMELT Quartz [9]. После 35 циклов ПЦР-амплификации фрагмента длиной 75 п. н. проводился анализ путем сравнения пиков кривых плавления. В зависимости от того, присутствует делеция или нет, плавление целевой последовательности происходит при разных температурах.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Для совершенствования и снижения стоимости молекулярно-генетической диагностики врожденных дефектов иммунной системы необходима разработка новых методов исследования, основанных на ПЦР. Анализ кривых плавления – это простой, быстрый и недорогой метод на основе ПЦР в режиме реального времени, используемый для идентификации генетических вариаций между популяциями и обнаружения генетических нарушений и однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в последовательностях нуклеиновых кислот. Данный метод позволяет обнаружить различия между температурами плавления аллелей с помощью используемого в смеси интеркалирующего красителя SYBR Green. Перед выполнением анализа кривых плавления необходимо оптимизировать дизайн праймера, смесь ПЦР и настройки программного обеспечения для получения точных и надежных результатов.

Данный метод не только полезен для выявления гомозиготных мутаций у пациентов с синдромом Ниймеген, для пренатальной диагностики, но также может быть использован для определения гетерозиготного носительства у родственников пациентов с целью выявления предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

Таблица 1
Последовательности олигонуклеотидов, используемых в технологии
Table 1
Primers used in the technique

NBS_wt	AGGACGGCAGGAAAGAAAACAA	Прямой праймер, специфичен к аллели дикого типа гена NBS1
NBS_deletion	CAGGAAAGAAATCTTCAAAGGGAAA	Прямой праймер, специфичен к аллели, несущей генетическое нарушение гена NBS1 с.657-661delACAAA
NBS_R	AACATAATTACCTGTTTGGCATTCA	Обратный праймер

Таблица 2
Состав реакционной смеси
Table 2
Composition of the reaction mixture

2X Микс с интеркалирующим красителем Eva Green (2X Color, АртБиоТех)	12,5 мкл
Вода	8 мкл
Праймер NBS1_wt (50 мкМ)	0,3 мкл
Праймер NBS1_deletion (50 мкМ)	0,3 мкл
Праймер NBS1_R (50 мкМ)	0,3 мкл
ДНК	2,6 мкл

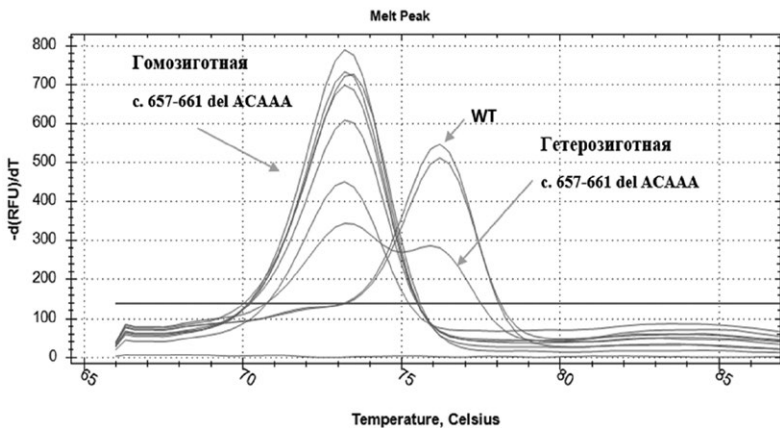
Таблица 3
Протокол проведения амплификации
Table 3
Amplification protocol

95 °C	5 минут	1 цикл
95 °C	10 с	35 циклов
60 °C + plate read	25 с	
72 °C	25 с	
65–95 °C melt curve	7 с + 0,2 °C	

Для выполнения данной технологии был определен дизайн праймеров (табл. 1), разработан оптимальный протокол ПЦР, позволяющий с высокой специфичностью провести амплификацию нужного фрагмента (табл. 2, 3).

Гомо- и гетерозиготные образцы идентифицировались по различиям в форме кривой плавления. Когда в целевой последовательности присутствует гомозиготная делеция, она детектируется как один результирующий пик плавления продукта ПЦР слева при температуре $73,2\pm0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; при отсутствии генетического нарушения будет детектироваться один пик справа при $76,2\pm0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, при наличии гетерозиготной делеции – два пика: первый (мутантный) слева при температуре $73,2\pm0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, второй (дикий тип) справа при температуре $76,2\pm0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (см. рисунок).

В 2025 году в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии технология выявления гомо- и гетерозиготной мутации в 6-м экзоне гена NBS1 с использованием ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления была проведена у 8 пациентов с гомозиготной мутацией, у 6 гетерозиготных носителей и у 10 здоровых детей. Данный альтернативный генетический вариант был также подтвержден с использованием капиллярного секвенирования по Сэнгеру. Расчет диагностической чувствительности и специфичности на основании результатов использования



Детекция гомозиготных и гетерозиготных мутаций методом ПЦР в режиме реального времени с использованием кривых плавления
Detection of homozygous and heterozygous mutations by real-time PCR using melting curves

Таблица 4
Сравнительная характеристика методов, применяемых для диагностики синдрома Ниймеген
Table 4
Comparative characteristics of the methods used for diagnosing the Nijmegen syndrome

Параметры		Результаты капиллярного секвенирования по Сэнгеру	
		Делеция	Здоровый
Результаты применения нового метода	Делеция	Истинно положительный (по новому методу) N=14 (100%)	Ложноположительный (по новому методу) N=0 (0%)
	Здоровый	Ложноотрицательный (по новому методу) N=0 (100%)	Истинно отрицательный (по новому методу) N=10 (100%)

разработанной методики выявил высокие показатели (100%), что позволяет его использовать в качестве метода молекулярно-генетической диагностики синдрома Ниймеген у пациентов и их родственников (табл. 4).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод кривых плавления, основанный на выявлении различий в денатурации продуктов реакции ПЦР в присутствии интеркалирующего красителя, позволяет идентифицировать генетические вариации в последовательностях нуклеиновых кислот. Разработанный ПЦР-анализ характеризуется низкой стоимостью, сокращенным временем выполнения и высокой чувствительностью, что создает перспективу его широкого применения в области лабораторно-диагностических исследований. Разработанная технология ПЦР в режиме реального времени для выявления гомо- и гетерозиготных мутаций основателя в гене NBS1 ориентирована на повышение эффективности диагностики синдрома Ниймеген. Созданный метод позволяет определить как гомозиготную делецию NBS1 657del5, которая ассоциирована с синдромом Ниймеген, так и гетерозиготное носительство у родственников пациентов с целью определения предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Poli M.C., Aksentijevich I., Bousfiha A.A., et al. Human inborn errors of immunity: 2024 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Hum Immun.* 2025;1(1):e20250003. doi: <https://doi.org/10.70962/jhi.20250003>

2. Hustinx T.W., Scheres J.M., Weemaes C.M., et al. Karyotype instability with multiple 7/14 and 7/7 rearrangements. *Hum Genet.* 1979;49:199–208. doi: 10.1007/BF00277643

3. Sharapova S.O., Pashchenko O.E., Bondarenko A.V., et al. Geographical distribution, incidence, Malignancies, and outcome of 136 eastern slav ic patients with nijmegen breakage syndrome and NBN founder variant c.657_661del5. *Front Immunol.* 2021;11:602482. doi: 10.3389/fimmu.2020.602482

4. Weemaes C.M., Hustinx T.W., Scheres J.M., et al. A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatrica.* 1981;70:557–564. doi: 10.1111/j.1651-2227.1981.tb05740.x

5. Varon R., Vissinga C., Platzer M., et al. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell.* 1998;93:467–76. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81174-5

6. Proudhon C., Hao B., Raviram R., et al. Long-range regulation of V(D)J recombination. *Adv Immunol.* 2015;128:123–82. doi: 10.1016/bs.ai.2015.07.003

7. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

8. Primer designing tool [Electronic resource]: Primer designing tool. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> (accessed: 28.05.2025)

9. uMELT Quartz [Electronic resource]: uMELT Quartz – DNA – UTAH.ORG. Available at: <https://www.dna-utah.org/umelt/quartz/um.php> (accessed: 28.05.2025)



<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.027>
УДК 577.112:616.36-004.4]:616-002-074



Першенкова О.С.✉, Михайлова Е.И.

Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

C-реактивный белок и алкогольная болезнь печени

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Першенкова О.С. – сбор и статистическая обработка данных, редактирование; Михайлова Е.И. – сбор и анализ результатов, написание текста.

Подана: 09.06.2025

Принята: 18.11.2025

Контакты: 70bssr@tut.by

Резюме

Введение. Алкогольная болезнь печени считается одним из наиболее распространенных заболеваний печени во всем мире. Она охватывает широкий спектр патологических состояний, начиная от простого стеатоза до стеатогепатита, фиброза и цирроза печени (ЦП). C-реактивный белок (СРБ) связан с воспалительными процессами, возникающими в результате повреждения печеночной ткани, с дисбиозом кишечника с развитием системного воспаления и дисфункции иммунной системы, инфекционными и другими осложнениями.

Цель. Определить валидность СРБ в качестве потенциального маркера прогрессирования алкогольной болезни печени (АБП).

Материалы и методы. Проведено открытое исследование типа случай – контроль, в которое вошли 92 пациента с АБП с признаками ЦП и 41 здоровый доброволец. Оценка уровней СРБ в сыворотке крови осуществлялась с использованием иммуноферментного анализа (ELISA).

Результаты. Уровень СРБ у пациентов с АБП превосходил таковой у здоровых добровольцев ($p < 0,0001$). СРБ возрастал по мере усугубления степени тяжести АБП, согласно классификации по Чайлду – Пью ($p = 0,0008$) и оценке MELD ($p = 0,01$). Рост уровня СРБ показал прямую корреляцию с некоторыми маркерами воспаления (лейкоцитами, нейтрофилами, скоростью оседания эритроцитов; $p < 0,05$) и повреждения печени (аспартатаминотрансферазой, гамма-глутамилтранспептидазой, щелочной фосфатазой; $p < 0,05$) и обратную – с показателями функции печени (альбумином; $p < 0,05$). Маркер ассоциирован с развитием таких осложнений АБП, как асцит и варикозные вены пищевода ($p < 0,05$).

Заключение. СРБ помогает выявить АБП и предсказать тяжесть поражения печени.

Ключевые слова: цирроз печени, C-реактивный белок, тяжесть поражения печени, алкогольная болезнь печени, маркер поражения печени

Pershenkova O.✉, Mikhailova E.
Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

C-Reactive Protein and Alcoholic Liver Disease

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Pershenkova O. – data collection and statistical processing, editing; Mikhailova E. – results collection and analysis, text writing.

Submitted: 09.06.2025

Accepted: 18.11.2025

Contacts: 70bssr@tut.by

Abstract

Introduction. Alcoholic liver disease is considered one of the most common liver diseases worldwide. It encompasses a wide spectrum of pathological conditions ranging from simple steatosis to steatohepatitis, fibrosis and cirrhosis (LC). C-reactive protein (CRP) is associated with inflammatory processes resulting from both liver tissue damage and intestinal dysbiosis with subsequent systemic inflammation and immune system dysfunction, infectious and other complications.

Purpose. To determine the validity of CRP as a potential marker of alcoholic liver disease progression.

Materials and methods. An open case-control study involving 92 patients with alcohol liver disease with signs of LC and 41 healthy volunteers was conducted. Serum CRP levels were assessed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results. CRP levels in patients with alcohol liver disease were higher than in healthy volunteers ($p<0.0001$). CRP increased with increasing severity of alcohol liver disease according to Child – Pugh classification ($p=0.0008$) and MELD score ($p=0.01$). The increase in CRP levels showed a direct correlation with some markers of inflammation (leukocytes, neutrophils, erythrocyte sedimentation rate; $p<0.05$) and liver damage (aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase; $p<0.05$), and an inverse correlation with indices of liver function (albumin; $p<0.05$). The marker is associated with the development of alcohol liver disease complications such as ascites and oesophageal varices ($p<0.05$).

Conclusion. CRP helps to detect alcohol liver disease and predict the severity of liver damage.

Keywords: cirrhosis, C-reactive protein, severity of liver damage, alcoholic liver disease, marker of liver damage

■ ВВЕДЕНИЕ

Постоянная тенденция к росту смертности от патологии, связанной со злоупотреблением алкоголем, является общей проблемой во многих регионах мира. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2018 году 48% пациентов с циррозом печени (ЦП) умерли из-за злоупотребления алкоголем [1]. Согласно проведенным исследованиям, если не принять превентивные меры, то к 2040 году смертность от алкогольной болезни печени (АБП) может увеличиться на 75%.



Это связано с растущим количеством людей, употребляющих алкоголь в опасных количествах, и с тем, что многие из них обращаются за медицинской помощью на поздних стадиях заболевания. Предполагается, что в ближайшие 20 лет от этого недуга умрет более миллиона человек, причем 35% смертей придется на людей в возрасте до 55 лет. Также ожидается, что частота декомпенсации алкогольного цирроза печени и развития гепатокарциномы повысится более чем на 65%. Согласно данным ВОЗ, даже небольшое уменьшение доли рискованного потребления алкоголя может привести к существенному уменьшению числа смертей от употребления алкоголя. Если уменьшить эту долю всего на 3%, можно избежать почти трети смертей, связанных с алкоголем [2].

C-реактивный белок (СРБ) – это белок, который является ключевым маркером воспаления в организме человека. Он синтезируется печенью и выделяется в кровь при воспалительных процессах. Повышенный уровень СРБ указывает на наличие воспаления, будь то инфекционного, аутоиммунного или вызванного травмой. Повышение уровня маркера может быть связано с циррозом печени, особенно на декомпенсированной стадии. Постоянно повышенный уровень СРБ у таких пациентов ассоциирован с высоким риском летального исхода. Повышение показателей маркера при циррозе печени связано с воспалительными процессами, возникающими в результате повреждения тканей печени, с дисбиозом кишечника с развитием системного воспаления и дисфункцией иммунной системы, инфекционными и другими осложнениями заболевания [3–5].

В настоящее время классификация Чайлда – Пью (Child – Pugh) и шкала MELD (Model for End-Stage Liver Disease) являются основными параметрами, определяющими прогноз ЦП. Они используются для оценки тяжести заболевания и прогнозирования выживаемости пациентов. Классификация Чайлда – Пью оценивает тяжесть ЦП на основании 5 или 6 клинических и лабораторных показателей, а шкала MELD – на основании 3 лабораторных показателей. Несмотря на положительные стороны, обе шкалы имеют определенные ограничения. Недостатком первой из них является субъективная интерпретация некоторых переменных. Вторая использует только объективные показатели и не учитывает ряд важных факторов, оказывающих значительное влияние на прогноз и тяжесть заболевания, что приводит к неточной оценке прогноза для конкретных пациентов. В результате 15–20% случаев остаются ошибочно классифицированными [6]. Кроме того, MELD рекомендуется не столько для оценки универсального прогноза пациентов, сколько для определения приоритетности пациентов для трансплантации печени [7–9].

По этой причине поиск предикторов прогрессирования АБП остается по-прежнему актуальным. Согласно имеющимся данным, в качестве таковых вполне может выступить СРБ. Однако опубликованные данные о роли СРБ в патофизиологических механизмах прогрессирования АБП и о возможности его использования в качестве маркера прогноза развития ЦП неоднозначны и требуют дальнейшего подтверждения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить валидность СРБ в качестве потенциального маркера прогрессирования АБП.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое исследование типа случай – контроль с формированием группы исследования из 92 пациентов с АБП с признаками ЦП и группы контроля – 36 здоровых добровольцев. Исследование соответствовало Хельсинкской декларации и было одобрено этическим комитетом УО «Гомельский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 24.03.21). Добровольное информированное согласие было получено у каждого субъекта до включения в исследование.

Диагноз АБП установлен в соответствии с клиническим протоколом «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения»: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь 01.06.2017 № 54 [10].

Критериями включения в группу исследования являлись возраст пациентов менее 75 лет, наличие подписанного информированного добровольного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных, подтвержденная АБП. Критерием невключения стало наличие хронического заболевания печени любой другой этиологии, кроме алкогольной, мультифокальная гепатоцеллюлярная карцинома, беременность и отказ от участия в исследовании.

Критерием включения в исследование для группы здоровых добровольцев было наличие подписанного информированного добровольного согласия на участие в исследовании и обработку персональных данных. Критериями невключения стали клинические симптомы каких-либо заболеваний на момент скрининга, любые хирургические вмешательства и/или прием лекарственных средств в течение не менее 3 месяцев на момент включения в исследование.

Оценка тяжести ЦП производилась с использованием шкалы Чайлда – Пью (англ. Child – Pugh) и индекса MELD (Model For End-Stage Liver Disease, модель терминальной стадии заболевания печени для пациентов от 12 лет и старше). Показатель MELD >20 баллов указывал на тяжелое заболевание печени. Класс А (Child A) соответствовал 5–6 баллам, класс В (Child B) – 7–9 баллам, класс С (Child C) – 10–15 баллам. Формирование и прогрессирование фиброза печени оценивали с помощью коэффициентов APRI (Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index, индекс соотношения аспартатаминотрансферазы к тромбоцитам) и FIB 4 (Fibrosis-4 index for liver fibrosis, индекс фиброза печени Фиброз-4). Значение коэффициентов APRI <0,5 и FIB 4 <1,3 свидетельствовало о невысокой степени, а APRI >1,7 и FIB 4 >2,67 – о высокой степени выраженности фиброза печени.

Концентрацию СРБ определяли путем проведения твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) согласно инструкции производителя наборов реагентов на базе научно-исследовательской лаборатории Гомельского государственного медицинского университета.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере при помощи пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США), лицензионный номер 12334567. Для проверки гипотезы о нормальности распределения использовался тест Колмогорова – Смирнова. Ввиду того, что распределение совокупности данных было отличным от нормального, непрерывные переменные представлялись в виде медианы (Me) с указанием 95% доверительного интервала (95% ДИ) и межквартильного размаха (P25–P75). При сравнении 3 и более независимых групп по количественному признаку применялся критерий Краскала – Уоллиса, при попарном сравнении – критерий Манна – Уитни. В качестве



специализированного непараметрического post-hoc теста использовался тест Коновера. В качестве меры взаимозависимости между рядами рангов применялся коэффициент ранговой корреляции Кендалла (τ). Диагностическую ценность параметра определяли по шкале значений площади под ROC-кривой (Area Under Curve, AUC). Оценивались чувствительность и специфичность метода, показатели воспроизводимости и соответствия (%). Диагностическая эффективность индекса считалась достаточно высокой при диагностической чувствительности 95–100% и диагностической специфичности 90–100%, удовлетворительной – при диагностической чувствительности 85–94% и диагностической специфичности 80–89%, неудовлетворительной – при диагностической чувствительности менее 85% и диагностической специфичности менее 80%. На всех этапах статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при значениях $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группу исследования был включен 51 мужчина (55,43%) и 41 женщина (44,57%), в группу контроля – 28 мужчин (77,78%) и 8 женщин (22,22%). Медиана (me) возраста субъектов исследования в группе пациентов с АБП составила 52 (95% ДИ: 48,0–56,0; P25–P75: 47,0–58,0) года, в группе здоровых добровольцев – 39,0 (95% ДИ: 34,0–44,0; P25–P75: 35,0–45,0) года ($p < 0,0001$).

На первом этапе проведена сравнительная оценка уровней СРБ в группе пациентов с АБП и в группе здоровых добровольцев. В группе пациентов с АБП медиана СРБ составила 20,28 мг/л (95% ДИ: 10,26–28,09; P25–P75: 5,17–52,11), в группе здоровых добровольцев медиана – 0,90 мг/л (95% ДИ: 0,50–1,59; P25–P75: 0,35–3,27). Различия между группами обладают статистической значимостью ($p < 0,0001$). Графическое изображение результатов анализа представлено на рис. 1.

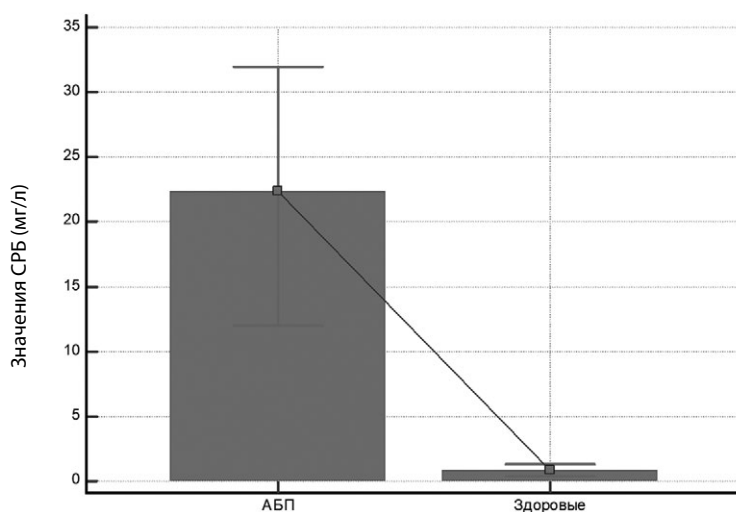


Рис. 1. Сравнение уровней СРБ в группе пациентов с АБП и в группе здоровых добровольцев
Fig. 1. Comparison of C-reactive protein levels in the group of patients with alcoholic liver disease and the group of healthy volunteers

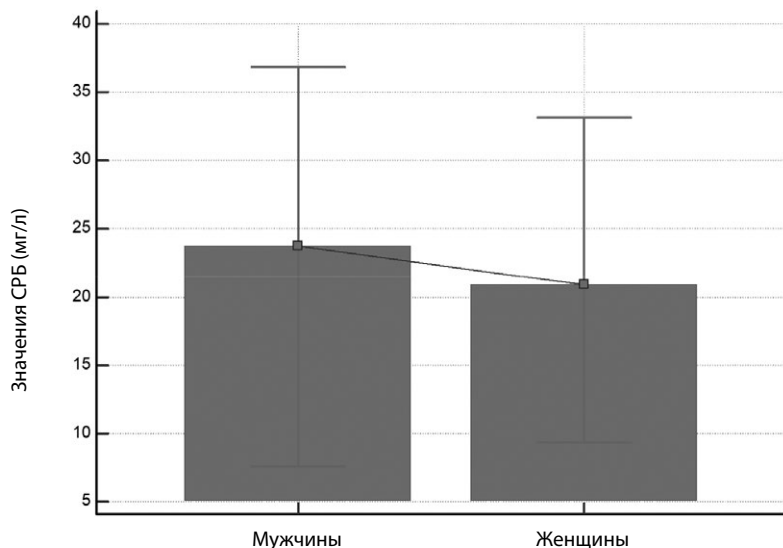


Рис. 2. Сравнение уровней СРБ в группе пациентов с АБП в зависимости от пола
Fig. 2. Comparison of C-reactive protein levels in the group of patients with alcoholic liver disease depending on gender

На втором этапе исследования изучено содержание СРБ в сыворотке крови в группе пациентов с АБП в зависимости от пола и возраста (рис. 2, 3).

Как видно из рис. 2, статистических различий по уровням СРБ в группе пациентов с АБП в зависимости от пола не обнаружено ($p=0,69$). У мужчин медиана СРБ составила 23,63 мг/л (95% ДИ: 7,49–34,49; P25–P75: 5,41–57,93), у женщин – 19,68 мг/л (95% ДИ: 6,45–31,90; P25–P75: 5,08–52,04).

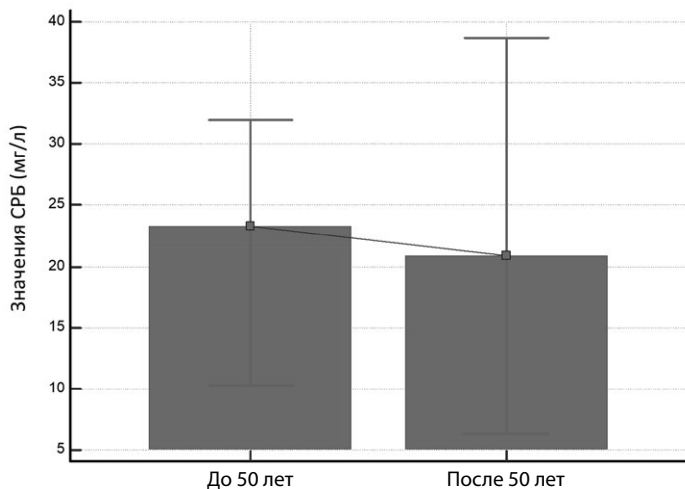


Рис. 3. Сравнение уровней СРБ в группе пациентов с АБП в зависимости от возраста
Fig. 3. Comparison of C-reactive protein levels in the group of patients with alcoholic liver disease depending on age

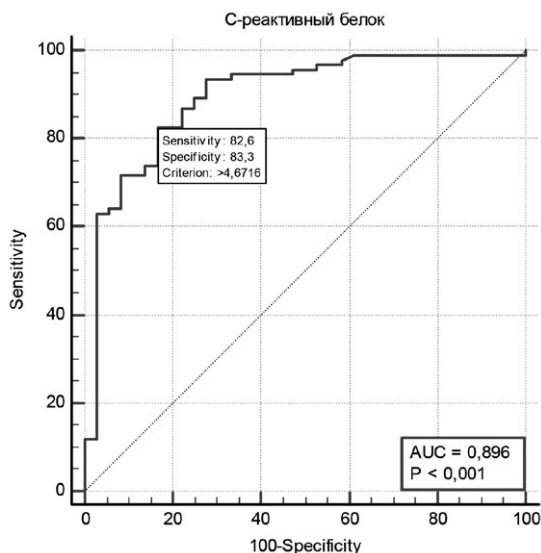


Рис. 4. ROC-анализ для оценки диагностических возможностей показателя СРБ в выявлении АБП
Fig. 4. ROC analysis to assess the prognostic power of C-reactive protein in the detection of alcoholic liver disease

Как следует из рис. 3, возрастных различий в группе пациентов с АБП по уровням СРБ не установлено ($p=0,47$). В группе пациентов с АБП в возрасте ≤ 50 лет медиана СРБ составила 23,64 мг/л (95% ДИ: 10,82–32,02; P25–P75: 6,47–61,68), в группе пациентов с АБП в возрасте > 50 лет – 18,60 мг/л (95% ДИ: 05,84–36,06; P25–P75: 4,99–50,07). На третьем этапе проведен анализ характеристических кривых (ROC-анализ) и определено пороговое значение СРБ, способное распознать АБП (рис. 4). Этот показатель составил 4,67 мг/л.

Согласно рис. 4, анализ ROC-кривых для СРБ как модели прогноза развития АБП показал очень хорошее качество ($AUC=0,87$).

Таблица 1
Результаты анализа взаимосвязи уровней СРБ со степенью тяжести АБП согласно классу по Чайлду – Пью
Table 1
Results of the analysis of relationship between C-reactive protein levels and alcoholic liver disease severity according to Child – Pugh grades

Класс тяжести ЦП по Чайлду – Пью										P ₁
Маркер	Класс А – 1 (n=19)			Класс В – 2 (n=44)			Класс С – 3 (n=29)			
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	
СРБ (мг/л)	6,09	1,80–17,25	1,72–18,9	15,5	5,84–31,93	5,08–61,44	42,4	23,67–55,68	21,47–59,81	0,0008
P ₂	0,03 (1,2); 0,04 (2,3); 0,0001 (1,3)									

Примечания: p₁ для критерия Краскела – Уоллиса; p₂ – для критерия Манна – Уитни.

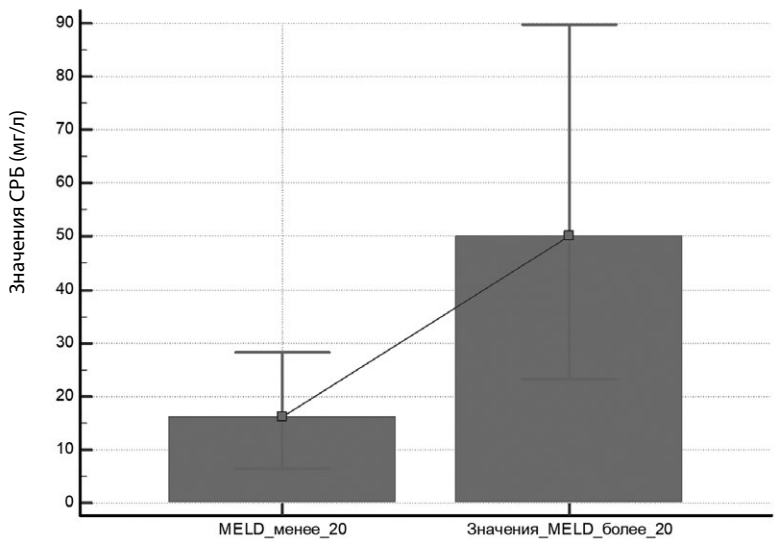


Рис. 5. Результаты анализа взаимосвязи уровней СРБ со степенью тяжести АБП согласно оценке по шкале MELD
Fig. 5. Results of the analysis of relationship between C-reactive protein levels and alcoholic liver disease severity as assessed by the MELD score

На четвертом этапе проведена оценка показателей СРБ в зависимости от степени тяжести АБП согласно критериям Чайлда – Пью и шкале MELD (табл. 1, рис. 5). Как видно из табл. 1, уровни СРБ возрастали по мере усугубления степени тяжести АБП согласно классификации по Чайлду – Пью. Как видно на рис. 5, при общем балле по шкале MELD ≤ 20 уровень СРБ (Me=13,46 мг/л; 95% ДИ: 6,07–27,17; P25–P75: 4,99–35,83) был статистически достоверно ниже по сравнению с таковым при общем балле по шкале MELD > 20 (Me=45,71 мг/л; 95% ДИ: 22,11–59,99; P25–P75: 14,29–85,58; $p=0,01$).

Таблица 2
Результаты анализа взаимосвязи уровней СРБ в группе пациентов с АБП со степенью тяжести фиброза печени, рассчитанного на основе индекса APRI и FIB 4
Table 2
Results of the analysis of relationship between C-reactive protein levels and the degree of liver fibrosis in the group of patients with alcoholic liver disease, calculated on the basis of the APRI index and FIB 4 index

Маркер	APRI										P		
	<0,5 балла						>1,5 балла						
	Me		95% ДИ		P25–P75		Me		95% ДИ			P25–P75	
СРБ (мг/л)	7,45		1,62–54,07		1,66–35,17		22,39		6,31– 35,97		5,30–53,80		0,32
	FIB 4										P		
	<1,3 балла				1,3–2,67 балла			>2,67 балла					
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75				
		42,48	5,93–79,68	5,99–80,03	20,88	4,79– 34,95	4,12–42,28	20,57	8,78– 35,22	5,36–57,53	0,63		

Таблица 3

Результаты анализа взаимосвязи между уровнями СРБ и традиционными маркерами воспаления
Table 3

Results of the analysis of relationship between C-reactive protein levels and conventional inflammatory markers

СРБ (мг/л)	Маркеры воспаления			
	ЛК	НТ	ОНЛ	СОЭ
τ	0,23	0,17	0,14	0,19
ρ	0,001	0,02	0,08	0,01

Примечания: τ – ранговый коэффициент корреляции по Кендаллу; ЛК – лейкоциты; НТ – нейтрофилы; ОНЛ – отношение нейтрофилов к лейкоцитам; СОЭ – скорость оседания эритроцитов.

Таблица 4

Результаты анализа взаимосвязи между уровнями СРБ и традиционно используемыми лабораторными тестами оценки функции печени
Table 4

Results of the analysis of relationship between C-reactive protein levels and liver function tests

СРБ (мг/л)	Показатели функции печени													
	АЛТ		АСТ		ЩФ		ГГТП		АБ		ОБ		МНО	
	τ	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ	ρ	τ	ρ
	0,12	0,10	0,23	0,002	0,21	0,005	0,30	0,0001	–0,18	0,02	0,11	0,15	0,05	0,54

Примечания: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; ЩФ – щелочная фосфатаза; ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; АБ – альбумины; ОБ – общий билирубин; МНО – международное нормализованное отношение.

На пятом этапе в группе пациентов с АБП оценена ассоциация уровней СРБ со степенью тяжести фиброза печени, рассчитанного на основе неинвазивных индексов APRI и FIB 4 (табл. 2).

Как видно из табл. 2, уровень СРБ не продемонстрировал зависимости от индексов APRI и FIB 4 ($p=0,32$ и $0,63$ соответственно).

На следующем этапе был проведен анализ связи СРБ с традиционными маркерами воспаления и функциональными пробами печени (табл. 3, 4).

Согласно табл. 3, уровень СРБ был ассоциирован с повышением ключевых маркеров воспаления, таких как лейкоциты, нейтрофилы и скорость оседания эритроцитов.

Согласно табл. 4, уровни СРБ показали положительную корреляцию с лабораторными тестами, отражающими синдром цитолиза (аспаратаминотрансферазой) и холестаза (щелочной фосфатазой и гамма-глутамилтранспептидазой), и отрицательную корреляцию с уровнем альбумина, отражающим формирование синдрома печеночно-клеточной недостаточности.

На заключительном этапе оценена связь уровней СРБ с развитием осложнений АБП (табл. 5).

Согласно табл. 5, в группе пациентов с АБП и асцитом уровни СРБ были статистически достоверно выше по сравнению с пациентами без асцита ($p=0,009$), и, напротив, в группе пациентов с АБП и варикозными венами в пищеводе значения маркера статистически достоверно были ниже по сравнению с таковыми без варикозных вен

Таблица 5
Сравнение уровней СРБ у пациентов с АБП в зависимости от наличия осложнений
Table 5
Comparison of C-reactive protein levels in patients with alcoholic liver disease depending on the presence of complications

СРБ (мг/л)	Осложнение						p
	Асцит						
	Есть (n=73)			Нет (n=19)			
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	0,009
	23,94	13,39–35,62	5,45–58,70	6,09	4,11–20,46	2,56–22,37	
	Варикоз вен пищевода						p
	Есть (n=71)			Нет (n=21)			
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	
	13,75	6,37–23,67	4,99–46,89	35,87	23,31–69,04	18,79–78,37	0,03
	Печеночная энцефалопатия						p
	Есть (n=65)			Нет (n=27)			
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	
	25,19	13,56–34,39	5,73–54,96	7,45	4,70–23,28	3,84–40,19	0,07
	Нарушение функции почек						p
	Креатинин <115 мкмоль/л (n=80)			Креатинин ≥115 мкмоль/л (n=12)			
	Me	95% ДИ	P25–P75	Me	95% ДИ	P25–P75	
	16,58	8,13–27,32	5,12–46,89	35,45	5,39–96,31	9,03–85,81	0,20

в пищеводе (p=0,03). При появлении печеночной энцефалопатии уровни СРБ демонстрировали тенденцию к повышению, которая статистической значимости не достигла (p=0,07).

В результате проведенного исследования установлено, что уровень СРБ у пациентов с АБП превышал таковой у здоровых добровольцев. Степень тяжести поражения печени ассоциировалась с более высокими значениями маркера согласно классификации Чайлда – Пью и шкале MELD. Значения СРБ демонстрировали положительную корреляцию с ключевыми показателями острой фазы воспаления (уровнем лейкоцитов, нейтрофилов и скоростью оседания эритроцитов), синдрома цитолиза (аспартатаминотрансферазой) и холестаза (щелочной фосфатазой и гамма-глутамилтранспептидазой) и отрицательную корреляцию с показателем синдрома печеночно-клеточной недостаточности – альбумина. Полученные результаты не противоречат данным литературы, согласно которым СРБ, являясь белком острой фазы, широко изучается как маркер слабовыраженного воспаления [11]. В большей степени это касается сердечно-сосудистых заболеваний, однако повышенные уровни СРБ были зарегистрированы и у пациентов с заболеваниями печени. В литературе присутствуют данные, подтверждающие повышенные уровни СРБ у пациентов с АБП и ассоциацию маркера со степенью тяжести поражения печени [12, 13]. Некоторые исследователи предлагают использовать тест определения СРБ в качестве неинвазивного маркера алкогольного гепатита [14]. Другие авторы, подтверждая высокие уровни СРБ у пациентов с АБП, демонстрируют связь маркера с плохим прогнозом заболевания [13]. Более того, часть исследователей даже предлагают использовать СРБ в качестве предиктора краткосрочной смертности у пациентов с АБП [15].



■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациентов с АБП повышение уровня СРБ в большей степени отражает процессы воспаления, способствующие прогрессированию патологического процесса в печени; при этом уровень СРБ может стать интегральным показателем течения и прогноза заболевания.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health. 2018. Available online: https://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en (accessed on 19 March 2021)
2. Julien J., Ayer T., Bethea E.D. Projected prevalence and mortality associated with alcohol-related liver disease in the USA 2019–40: A modelling study. *Lancet Public Health*. 2020;5:316–323.
3. Di Martino V., Weil D., Cervoni J.-P. New prognostic markers in liver cirrhosis. *World J Hepatol*. 2015;7:1244. doi: 10.4254/wjh.v7.i9.1244
4. Ruf A.E., Villamil F.G. C-reactive protein and model for end-stage liver disease score: Have we found the fifth element? *Liver Transplantation*. 2015;21:713–715. doi: 10.1002/lt.24140
5. Woodhouse C.A., Patel V.C., Goldenberg S. PROFIT, a PROspective, randomised placebo controlled feasibility trial of Faecal Microbiota Transplantation in cirrhosis: study protocol for a single-blinded trial. *BMJ Open*. 2019;9:518. doi: 10.1136/bmjopen-2018-023518
6. Kamath P.S., Kim W.R. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. 2007;45:797–805. doi: 10.1002/hep.21563
7. Peng Y., Qi X., Guo X. Child – Pugh versus MELD score for the assessment of prognosis in liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Medicine*. 2016;95:2877. doi: 10.1097/MD.0000000000002877
8. Burak K.W., Meeberg G.A., Myers R.P. Validation of the model of end-stage liver disease for liver transplant allocation in Alberta: implications for future directions in Canada. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016;2016:132. doi: 10.1155/2016/1329532
9. Cheng X.-P., Zhao J., Chen Y. Comparison of the ability of the PDD-ICG clearance test, CTP, MELD, and MELD-Na to predict short-term and medium-term mortality in patients with decompensated hepatitis B cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2016;28:444. doi: 10.1097/MEG.0000000000000538
10. Clinical protocol "Diagnosis and treatment of patients with diseases of the digestive organs", approved by the resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus. 2017;54:167. (in Russ.)
11. Kaptoge S., Di Angelantonio E., Pennells L. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med*. 2012;367(14):1310–1320. doi: 10.1056/NEJMoa1107477
12. Jangam M., Nandeesh H., Kadiravan T. Association of Severity Serum Iron Indices and High-sensitivity C-reactive Protein with Disease Severity in Men with Alcoholic Liver Disease. *Indian J Med Biochem*. 2021;25(3):96–99.
13. Ciećko-Michalska I., Szczepanek M., Cibor D. Serum cytokine concentration as prognostic factor in patients with alcoholic liver disease. *Przegl Lek*. 2006;63(5):249–252.
14. Pieri G., Agarwal B., Burroughs A.K. C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Ann Gastroenterol*. 2014;27(2):113–120.
15. Soultati A.S., Dourakis S.P., Alexopoulou A. Predicting utility of a model for end stage liver disease in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12(25):4020–4025. doi: 10.3748/wjg.v12.i25.4020



Huda Kadhim Kareem✉, Shaymaa Jabbar Raisan
College of Education for Pure Sciences, University of Basrah, Basrah, Iraq

Evaluation of the Concentration of Bioenzyme Glutamic Acid Decarboxylase in the Sera of Type 1 and Type 2 Diabetic Patients

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Huda Kadhim Kareem – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, writing – original draft and & editing; Shaymaa Jabbar Raisan – conceptualization, investigation, methodology, project administration, supervisor, writing – original draft and editing.
The article is published in author's edition.

Submitted: 02.05.2025

Accepted: 30.09.2025

Contacts: huda.kareem@uobasrah.edu.iq

Abstract

Introduction. Currently, great attention is paid to clinical use of biomarkers to diagnose various diseases. Biomarkers are understood to be clinical laboratory tests, whose findings are considered to be characteristic of a particular form of pathology. Their use in the early stages of the disease significantly improves the effectiveness of both diagnosis and treatment. One such biomarker is the test for glutamate dehydrogenase (GDH) activity in blood serum. The interest in its study is determined by the fact that GDH is an enzyme involved in regulating many vital metabolic processes. Therefore, numerous studies are currently being conducted to determine not only levels of the enzyme itself in biological fluids, but also those of its antibodies.

Purpose. To evaluate the prevalence of GAD concentration in patients with type 1 and type 2 diabetes and interpret the results obtained.

Materials and methods. Blood samples were collected from males only, 30 people with T1D diabetes, 30 blood samples from people with T2D diabetes, and 24 people without diabetes in Basra Governorate. Serum samples were examined for the presence of GAD by sandwich ELISA.

Results. The results indicated a significant decrease in the concentrations of GAD in the serum of male patients with T1D and T2D diabetes at a rate of $(3.41 \pm 0.43 \text{ ng/ml (mcg/l)})$ and $(3.43 \pm 0.34 \text{ ng/ml (mcg/l)})$, respectively. In the age groups of T1D diabetes patients, we found a slight variation in the concentrations of GAD for people with the category (≥ 15) $3.29 \pm 0.51 \text{ ng/ml (mcg/l)}$ compared to the age group (< 15) $3.53 \pm 0.73 \text{ ng/ml (mcg/l)}$, the age groups of T2D patients (≤ 45) reached $2.63 \pm 0.51 \text{ ng/ml (mcg/l)}$, and the second age group (> 45) recorded a significant increase the first, which is as the concentrations of GAD reached $4.06 \pm 0.41 \text{ ng/ml (mcg/l)}$.

Conclusion. The decrease in serum GAD levels observed in patients with diabetes mellitus, reflecting a deficiency of the enzyme required for vital metabolic processes, may affect the production of gamma-aminobutyric acid, which is necessary for maintaining the function of pancreatic beta cells.

Keywords: type 1 and 2 diabetes, GAD, biomarkers, bioenzyme, ELISA



Худа Кадим Карим✉, Шайма Джаббар Райсан
Колледж фундаментальных наук, Университет Басры, Басра, Ирак

Возрастные особенности содержания глутаматдекарбоксилазы в сыворотке крови пациентов (мужчин) с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Худа К.К. – концепция, обработка данных, проведение исследований, методология, ведение проекта, написание чернового варианта статьи, редактирование; Шайма Дж.Р. – концепция, научное руководство, проведение исследований, методология, ведение проекта, написание чернового варианта статьи, редактирование. Статья опубликована в авторской редакции.

Подана: 02.05.2025

Принята: 30.09.2025

Контакты: huda.kareem@uobasrah.edu.iq

Резюме

Введение. В настоящее время большое внимание уделяется использованию в клинической практике биомаркеров различных заболеваний. Под биомаркерами принято понимать клинико-лабораторные тесты, изменение показателей которых оказывает весьма характерным для той или иной формы патологии. Их применение на ранних стадиях заболевания существенно повышает эффективность диагностики и лечения. Одним из биомаркеров является тест определения активности глутаматдегидрогеназы (ГДК) сыворотки крови. Интерес к его исследованию определяется тем, что ГДК является ферментом, регулирующим многие жизненно важные метаболические процессы. Поэтому в настоящее время ведутся многочисленные исследования не только содержания в биологических жидкостях самого фермента, но и антител к нему.

Цель. Провести анализ содержания ГДК в сыворотке крови пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа и интерпретировать полученные результаты.

Материалы и методы. Исследованы образцы крови у лиц мужского пола разного возраста – у 30 пациентов с сахарным диабетом 1-го типа, у 30 пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и у 24 лиц, не страдающих диабетом, из провинции Басра. Образцы сыворотки крови были исследованы на наличие ГДК «сэндвич»-методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Результаты. Полученные результаты свидетельствуют о достоверном снижении уровня ГДК в сыворотке крови мужчин с СД 1-го и 2-го типа. Содержание ГДК в сыворотке крови 30 пациентов с СД 2-го типа составило $3,43 \pm 0,34$ нг/мл (мкг/л) при уровне его в контрольной группе (по результатам исследования 14 проб стандартных образцов) $3,9 \pm 0,52$ нг/мл (мкг/л) ($p \leq 0,05$). У пациентов с СД 1-го типа выявлено незначительное изменение концентрации ГДК в возрастной группе лиц 15 лет и старше: $3,29 \pm 0,51$ нг/мл (мкг/л). У пациентов с СД 2-го типа возрастной группы 45 лет и менее (≤ 45 лет) уровень ГДК составил $2,63 \pm 0,51$ нг/мл (мкг/л). В возрастной группе пациентов старше 45 лет (> 45 лет) было констатировано его увеличение по сравнению с таковым в возрастной группе 45 лет и менее: концентрация ГДК в ней достигла значения $4,06 \pm 0,41$ нг/мл (мкг/л).

Заключение. Отмеченное у пациентов с сахарным диабетом снижение концентрации ГДК в сыворотке крови, отражающее недостаток фермента, требуемого для обеспечения жизненно важных метаболических процессов, может повлиять на выработку гамма-аминомасляной кислоты, необходимой для поддержания функции бета-клеток поджелудочной железы.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го и 2-го типа, глутатиондегидрогеназа (ГДК), биомаркеры, иммуноферментный анализ (ИФА)

■ INTRODUCTION

According to the International Diabetes Federation (IDF), the global report estimates that adults with diabetes are around 537 million. The death rate due to diabetes is 6.7 million, and the cost of care and treatment of the disease is estimated at 966 billion US dollars [1]. It is worth noting that diabetes mellitus (DM) is one of the silent killer diseases worldwide. Abnormally high blood sugar levels characterize this metabolic disorder due to the loss of beta cells in the pancreatic islets. Consequently, it loses its ability to produce and secrete insulin, causing serious dysfunction in the function of target tissues [2–4].

Glutamic acid decarboxylase (GAD) is an important key enzyme that catalyzes the irreversible alpha-decarboxylation of glutamate to produce the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA). This enzymatic reaction is a promising method for the synthesis of GABA. It is a non-protein amino acid that reduces the amount of communication to and from nerves [5]. Many studies and research have proven that systemic treatment with GABA acid prevents or alleviates T1D diabetes by suppressing the autoimmune response and stimulating pancreatic beta cells by increasing insulin secretion. In addition, GABA acid prevents programmed cell death (apoptosis) and stimulates their regeneration. It has an anti-inflammatory effect and suppresses autoimmunity in pancreatic beta cells. However, it is not clear how GABA mediates these effects [6].

Previous clinical trials of interventional therapies for T1D were not able to maintain insulin production in the long term. This led to the belief that combination therapies that control autoimmunity are necessary for effective intervention in T1D are needed [7, 8].

Diabetes mellitus (T1D) leads to serious complications despite intensive treatment. In order for the disease to be more moderate, the remaining beta cell function must be preserved. This prevents complications and increases the patient's survival. It is worth mentioning in the same context that immune interventions have limited effects and may have negative risks. Therefore, one of the promising experiments is injecting the lymph nodes with the GAD enzyme with oral vitamin D [9, 10].

■ PURPOSE OF THE STUDY

To evaluate the prevalence of GAD concentration in patients with type 1 and type 2 diabetes and interpret the results obtained.



■ MATERIALS AND METHODS

Study Design and Setting

The study sample was carefully selected to ensure a diverse representation of the current study community. It is worth noting that ethical insurances were taken according to the contexts followed by the health institution in Basrah Governorate. This was during the period from mid-December 2023 to late May 2024.

Sample Selection

Blood samples were collected from males only, 30 people with T1D diabetes who were less than 30 years old. 30 blood samples were collected from people with T2D diabetes who were more than 30 years old. Also, 24 people without diabetes were collected, 10 of whom were less than 30 years old and 14 of whom were more than 30 years old. The patients attended Al-Shifa Teaching Hospital, the Endocrinology and Diabetes Center at Al-Faihaa Hospital, and the Endocrinology Center at Al-Mawani Hospital in Basra Governorate. Specialist doctors previously diagnosed diabetic patients. As for healthy people, their lack of diabetes was determined through verbal questions directed to them, their parents, or their companions. Regarding the age information of all study samples, it was done through direct oral questioning as before. Thus, the representation of the study samples is balanced to ensure a clear view of the central tendency of these samples.

Blood samples were collected at each collection during the above period. Then, serum was separated from all samples (each 3 ml). Then, serum was isolated in Eppendorf tubes. The samples were tested for the presence of GAD enzyme as a biomarker by Sandwich ELISA from BT LAB, China, according to the instructions of the diagnostic kit manufacturer.

Statistical Analysis

Statistical Package of Social Sciences (SPSS) software was used for statistical analysis. Measured parameter values were given as mean $\pm$ SE. For group comparisons, Mann – Whitney Test and T-Test were used to analyze the results, When the p-value was less than 0.05, the results were considered statistically significant.

■ RESULTS

Estimation of GAD Enzyme Concentration in T1D Diabetic Patients

The current study showed a significant decrease in GAD enzyme concentrations in the serum of 30 T1D diabetic male patients when compared to standard samples (non-diabetic). The arithmetic mean (SD) and SE for T1D patients were 3.41 $\pm$ 0.43 ng/ml, while the concentrations in the serum of the standard sample were the highest, reaching 5.36 $\pm$ 1.57 ng/ml. No statistically significant difference was observed in GAD concentration between T1D diabetic patients and the standard sample at P $\leq$ 0.05 (Table 1).

We divide the age groups of T1D diabetes patients, the results showed a slight difference in the concentrations of GAD enzyme for people with the age group less than or equal to 15 years ($\geq$ 15) and their number is 16 patients, which is 3.29 $\pm$ 0.51 ng/ml. In comparison with the concentrations of people with this disease in the age group greater than 15 years (<15) and their number is 14 patients, their concentration was 3.53 $\pm$ 0.73 ng/ml. Note that the highest age group is 30 years, and the lowest age group is 3 years. The results of the statistical analysis showed that there is no statistically significant difference

Table 1
GAD enzyme concentration in sera of T1D diabetic patients and standard samples

Probability P	CI 95%		Standard sample (10 samples) Mean ± Standard error ng/ml	CI 95%		Pathological sample (30 samples) Arithmetic mean ± standard error ng/ml	T1D patients
	Highest value	Less value		Highest value	Less value		
P≤0.05	18.84	1.81	5.36 ± 1.57	11.79	0	3.41 ± 0.43	Enzyme GAD

Table 2
GAD enzyme according to the distribution of T1D patient samples according to age groups

Probability P	95% CI		ELIZA Test Results Mean±SE ng/ml	No. (30)	Age group (years)
	Highest value	Less value			
P≤0.05	6.07	0	3.29±0.512	16	year ≥15
	11.79	0	3.53 ±0.73	14	year <15

in the concentration of GAD between people with T1D diabetes in the two age groups at P≤0.05 (Table 2).

Measuring GAD Enzyme Concentration in T2D Diabetic Patients

The concentration of GAD enzyme was estimated in blood serum samples of 30 T2D diabetic patients (males). A slight variation was observed in their GAD enzyme concentration with its concentration in the standard sample (non-diabetic) of 14 individuals. The arithmetic mean and standard error of GAD enzyme concentrations in the serum of T2D patients was 3.43±0.34 ng/ml. In contrast, its concentration in the standard samples was 3.9±0.52 ng/ml. The results of the statistical analysis showed that there was no statistically significant difference in GAD concentration between individuals with T2D diabetes and the standard sample at a probability level of P≤0.05 (Table 3).

As for the age groups of T2D patients, who numbered 30 patients, they were divided into two age groups. The first age group is less than or equal to 45 years (≤45), and their number is (12 patients). The arithmetic mean and standard error for this group was 2.63±0.517387 ng/ml. In contrast, the second age group recorded a significant increase over the first age group, which includes T2D diabetes patients who are over

Table 3
GAD enzyme concentration in sera of T2D diabetic patients and standard samples

Probability P	95% CI		Standard sample (14 samples) Mean ± Standard error ng/ml	95% CI		Pathological sample (30 samples) Arithmetic mean ± standard error ng/ml	T2D patients
	Highest value	Less value		Highest value	Less value		
P≤0.05	9.57	0.49	3.9±0.52	6.92	0	3.43±0.34	Enzyme GAD

Table 4
Shows the levels of GAD enzyme according to the distribution of T2D patient samples according to age groups

P probability	95% CI		ELIZA Test Results Mean $\pm$ Standard Error ng/ml	No. (30)	Age group (years)
	High value	Less value			
P $\leq$ 0.05	6.69	0	2.63 $\pm$ 0.51	12	$\leq$ 45 year
	6.92	0.91	0.41 $\pm$ 4.06	18	>45 year

Table 5
Shows a comparison of the results of GAD enzyme concentration in the serum of T1D and T2D diabetic patients

p	95% confidence limits		Pathological sample (30 samples) Arithmetic mean $\pm$ standard error ng/ml	Diabetic patients category
	High value	Less value		
P $\leq$ 0.05	11.79	0	3.41 $\pm$ 0.43	T1D
	6.92	0	3.43 $\pm$ 0.34	T2D

45 years (>45), and their number is (18 patients). Their arithmetic mean and standard error was 4.06 $\pm$ 0.41 ng/ml. The statistical analysis showed in its results that there is a statistically significant difference in the concentration of the GAD enzyme between people with T2D diabetes in the two age groups at a probability level of P $\leq$ 0.05 (Table 4).

Results of GAD Enzyme Concentration in the Serum of T1D and T2D Diabetic Patients

Suppose the results of GAD enzyme concentration levels in the serum of T1D and T2D diabetic patients are compared. In that case, we notice a slight difference in the arithmetic mean and standard error for patients with the two types of diabetes. The arithmetic mean and standard error for T1D diabetes were 3.41 $\pm$ 0.43165 ng/ml, which is the highest concentration. In contrast, the concentration of GAD enzyme in T2D diabetic patients was 3.431 $\pm$ 0.348271 ng/ml, which is the lowest. The results of the statistical analysis showed that there was no statistically significant difference in GAD concentration between people with T1D and T2D diabetes at the probability level of P $\leq$ 0.05 (Table 5).

DISCUSSION

The results of the current study showed a significant decrease in GAD enzyme in T1D patients compared to its normal concentrations that we observed in the standard sample group (non-diabetic). The GAD enzyme has been identified as an important autoantigen in the function of pancreatic beta cells. However, it is targeted by autoantibodies that work to weaken the pivotal function of this enzyme and inhibit its activity in insulin secretion. Pancreatic beta cells manufacture this enzyme, which enters into the process of synthesis of the amino acid GABA in beta cells. This acid is later stored in small vesicles in the cytoplasm until it is secreted. It is also secreted by circulating immune cells. It has been mentioned that it often has a suppressive effect on immune cells, preventing them from producing inflammatory cytokines through the GABA-A receptor, which is expressed

in T and B cells and some mononuclear cells [11]. It also has a role in regenerating the islets, especially in cases of diabetes, by maintaining or renewing the mass of beta cells [12, 13]. It has a role in secreting hormones and thus may increase the survival of beta cells. Most importantly, autoantibodies to the GAD enzyme that produces GABA are linked to the development of T1D diabetes. In it, the cell mass decreases or disappears, while in T2D diabetes, the function of beta cells is at risk. All of these events lead to an abnormal increase in blood sugar levels [14,15].

It is clear from the results of the current study that patients have something that contributes to achieving this decrease in the concentration of the GAD enzyme, which is the production of autoantibodies that, in turn, target the GAD enzyme. This is consistent with what was stated by Fahd AL-Mulla, 2023 and a group of researchers in a study conducted at the Dasman Diabetes Institute in Kuwait. The presence of autoantibodies in the peripheral blood and high blood sugar are the main features of type 1 diabetes. However, in contrast, approximately half of new cases of type 1 diabetes in adults are incorrectly diagnosed as type 2 diabetes T2D. This indicates and confirms the importance of testing for autoantibodies to distinguish T1D from other forms of diabetes [16, 17]. One of the most prominent evidence that the immune system contributes to the occurrence and development of the disease is the discovery of autoantibodies directed against pancreatic islets of Langerhans antigens. Specifically, beta cell antigens and one of these autoantibodies is the antibody directed at the enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD), known as (anti-GAD IgG). It is found in 50% to 80% of T1D patients [18]. The enzyme GAD catalyzes the synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA), which is an important neurotransmitter in the central nervous system. This enzyme has two forms, GAD65 and GAD67, and they are known to be produced in the brain and pancreas in humans. However, the most prevalent and widespread is GAD65 in pancreatic beta cells [14]. It is worth noting here that antiGAD is likely the first autoantibody to be discovered clinically in the blood [19, 20]. Glutamic acid decarboxylase (GAD) significantly influences glucose metabolism and insulin secretion. It thus contributes to overall metabolic homeostasis. Dysfunction of GAD has been associated with metabolic disorders such as diabetes and obesity. Recent research has explored the complex pathways involved in clinical and laboratory research of GAD, identifying potential therapeutic targets for metabolic diseases. However, challenges and limitations still exist in current research on GAD. Further investigation and ongoing research are warranted [21, 22].

We noticed through the results of the ELISA test for the concentration levels of the GAD enzyme in the serum of T1D diabetic patients according to the ages of these patients for the two age groups less than or equal to 15 years and the second group for patients for ages greater than 15 years. Note that the least that addressed the value of benefiting from the presence of the GAD enzyme naturally in the peripheral blood of the human body as a self-antigen that triggers an autoimmune response of T cells and B cells that produce autoantibodies to this enzyme. Thus, these studies benefited from this sign as a diagnostic method, which is the presence of autoantibodies called GAD autoantibodies. People carrying these antibodies were considered to have type 1 diabetes T1D or latent diabetes mellitus LADA. Among these studies, they indicated the value of predictions of autoantibodies to the GAD enzyme (antiGAD65), which were well validated and suggested as biomarkers and early diagnostic indicators for the stages before the onset of clinical

symptoms of the disease [23, 24]. The results of our study also showed a difference in the concentration of the GAD enzyme in T2D patients with its concentration in the standard sample. Despite that, they suffer from T2D diabetes. Hence, we find it very important to assume that in these patients, the level of GAD is higher than its concentration in the standard sample, which may have led to a clear defect and deficiency in the synthesis of GABA, which is important for the health, reproduction and activity of beta cells, as we mentioned previously. Our hypothesis can be supported theoretically through what was mentioned in some recent studies. GABA is considered an anti-diabetic factor for T2D. It was noted that the low concentration has an anti-diabetic effect through its action on the reproduction of pancreatic beta cells [25]. Another study showed that GABA improves high blood sugar in male mice with fat-induced diabetes by reducing gluconeogenesis. However, this effect was not observed in their offspring [26].

■ CONCLUSION

The current study concluded that there is a relationship between the development of type 1 and type 2 diabetes and GAD enzyme levels. This has an impact in view of many studies in addition to our current study, which confirmed the imbalance in the normal levels required for the vital processes associated with it, especially its entry as an important factor in the formation of gamma-aminobutyric acid to maintain pancreatic beta cells. From this standpoint, it is worth noting the importance of taking it also from the molecular, experimental and therapeutic point of view in an intensive manner.

■ REFERENCES

1. Ogurtsova K, Guariguata L, Barendo NC, et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes research and clinical practice*. 2022;183:109118.
2. Mbara KC, Fotsing MC, Ndinteh DT, et al. Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cell dysfunction: The potential therapeutic role of dietary flavonoids. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2024;100184.
3. Saleem, R. Relationship between glycemic control and different insulin regimens in pediatric type 1 diabetes mellitus. *The Medical Journal of Basrah University*. 2023;41(1):62–70.
4. Ali J, Hadad NS, Albrahimi N. Serum and urinary TGF- β 1 in diabetic nephropathy patients. *Medical Journal of Basrah University*. 2023;41(2):177–187.
5. Chen Z, Wang R, Song Y, et al. Expression and Transformation Characteristics of a Novel Glutamic Acid Decarboxylase LcGAD10s and Its Application on Sufu Processing. *Foods*. 2023;12(17):3186.
6. Espes D, Liljebäck H, Hill H, et al. GABA induces a hormonal counter-regulatory response in subjects with long-standing type 1 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021;9:e002442.
7. Tian J, Dang H, Karashchuk N, Xu I, Kaufman DL. A Clinically Applicable Positive Allosteric Modulator of GABA Receptors Promotes Human β -Cell Replication and Survival as well as GABA's Ability to Inhibit Inflammatory T Cells. *J Diabetes Res*. 2019;2019:5783545.
8. Casas R, Dietrich F, Barcenilla H, et al. Glutamic Acid Decarboxylase Injection Into Lymph Nodes: Beta Cell Function and Immune Responses in Recent Onset Type 1 Diabetes Patients. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:564921.
9. Hill H, Elksnis A, Lundkvist P, et al. Endogenous Levels of Gamma Amino-Butyric Acid Are Correlated to Glutamic-Acid Decarboxylase Antibody Levels in Type 1 Diabetes. *Biomedicines*. 2022;10(1):91.
10. Hagan DW, Ferreira SM, Santos GJ, Phelps EA. The role of GABA in islet function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:972115.
11. Jin Z, Korol SV. GABA signalling in human pancreatic islets. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1059110.
12. Al-Mulla F, Alhomaidah D, Abu-Farha M, et al. Early autoantibody screening for type 1 diabetes: a Kuwaiti perspective on the advantages of multiplexing chemiluminescent assays. *Front Immunol*. 2023;14:1273476.
13. Awchi DW, Rasool SN. Evaluation of Anti-GAD65 and HbA1c Prevalence among Newly Diagnosed Type 1 Diabetes of Some Iraqi Children. *Iraqi Journal of Industrial Research*. 2022;9:125–130.
14. Bedi S, Richardson TM, Jia B, et al. Similarities between bacterial GAD and human GAD65: Implications in gut mediated autoimmune type 1 diabetes. *PLoS One*. 2022;17(2):e0261103.
15. Cherix A, Donati G, Lizarbe B, et al. Excitatory/inhibitory neuronal metabolic balance in mouse hippocampus upon infusion of [U- ^{13} C]₆glucose. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021;41(2):282–297.
16. Felton JL, Redondo MJ, Oram RA, et al. Islet autoantibodies as precision diagnostic tools to characterize heterogeneity in type 1 diabetes: a systematic review. *Commun Med (Lond)*. 2024;4(1):66.

17. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, et al. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023 [published correction appears in Diabetes Care]. 2023;46(5):1106.
18. Kawasaki E. Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12):10012.
19. Belhiba O, Aadam Z, Jeddane L, et al. Research of anti-GAD and anti-IA2 autoantibodies by ELISA test in a series of Moroccan pediatric patients with diabetes type 1. *Afr Health Sci*. 2020;20(3):1337–1343.
20. Selman NA, Alwan Albayati AH, Alsaffar Y. Role of antiGAD65 Ab Cpeptide level and clinical characteristics in classification of newly diagnosed diabetes in patients aged 20–40 years. *Ann Trop Med&Public Health*. 2020;23:133–8.
21. AL-Madany RA, ALI HH, Mohammed A, Kawkab A. Effect of duration of diabetic in glutamic acid decarboxylase autoantibodies and HbA1c in children with T1DM. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2023;18:870–876.
22. Janež A, Guja C, Mitrakou A, et al. Insulin Therapy in Adults with Type 1 Diabetes Mellitus: a Narrative Review. *Diabetes Ther*. 2020;11(2):387–409.
23. Sutedja JC, Liyis BG, Saraswati MR. Gamma-aminobutyric acid for delaying type 1 diabetes mellitus:an update. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2024;29(3):142–151.
24. Zhang Y, Pan XF, Chen J, et al. Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia*. 2020;63:21–33.
25. Rezazadeh H, Sharifi MR, Sharifi M, Soltani N. Gamma-aminobutyric acid attenuates insulin resistance in type 2 diabetic patients and reduces the risk of insulin resistance in their offspring. *Biomed Pharmacother*. 2021;138:111440.
26. Hosseini Dastgerdi A, Sharifi M, Soltani N. GABA administration improves liver function and insulin resistance in offspring of type 2 diabetic rats. *Sci Rep*. 2021;11(1):23155.



<https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.1.029>
УДК 618.19



Черкасова Ю.Б.¹, Жедринская Е.В.², Соколова А.И.¹, Ребров Д.С.¹, Абдуллаева А.Р.¹,
Цибирова А.Р.¹, Павлов Б.В.¹ ✉

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

² Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна,
Москва, Россия

Значение цитологической диагностики методом тонкоигольной аспирационной биопсии при карциноме молочной и щитовидной желез: клинический случай

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция статьи – Черкасова Ю.Б., Жедринская Е.В., Павлов Б.В.; сбор материала – Ребров Д.С., Соколова А.И., Абдуллаева А.Р.; написание текста – Цибирова А.Р., Павлов Б.В.; редактирование текста – Павлов Б.В., Соколова А.И.
Информированное согласие: авторы имеют подписанное информированное согласие пациентки на анонимное опубликование ее данных в медицинском издании.

Подана: 10.04.2025

Принята: 24.09.2025

Контакты: bohdanpavlov@yandex.ru

Резюме

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) занимает второе место по частоте среди всех видов рака (после рака легких), а среди женщин РМЖ занимает первое место среди всех злокачественных новообразований (ЗНО), демонстрируя тенденцию к постоянному росту заболеваемости. РМЖ часто метастазирует в отдаленные органы, в том числе в щитовидную железу. Среди всех метастатических поражений щитовидной железы 7,8% случаев являются следствием РМЖ. Диагностика ЗНО в молочной и щитовидной железах представляет определенные трудности. Несмотря на скрининговые программы обследования, велика вероятность получения ложноотрицательных диагностических результатов. Тонкоигольная аспирационная цитологическая пункционная биопсия (ТАЦПБ) является одним из быстрых, дешевых, эффективных и комфортных методов диагностики пальпируемых и наблюдаемых на УЗИ поражений молочной и щитовидной желез.

Цель. Анализ преимуществ аспирационной биопсии и цитологического метода исследования опухоли молочной железы с метастазами в щитовидную железу.

Материалы и методы. В статье рассмотрен клинический случай женщины 61 года с объемным образованием в левой молочной железе и метастатическим образованием в правой доле щитовидной железы.

Результаты. Несмотря на ложноотрицательную диагностику опухоли (по данным УЗИ) в ходе диспансеризации, пациентка самостоятельно пальпаторно определила объемное образование в левой молочной железе. Повторное УЗИ выявило объемное образование левой молочной железы с итоговой оценкой BI-RADS 5, а также гипоехогенное узловое образование правой доли щитовидной железы с оценкой

TIRADS 4. Биопсия (толстой иглой) левой молочной железы с цитологическим исследованием и ТАЦПБ правой доли щитовидной железы позволили обнаружить клетки карциномы в обоих поражениях.

Заключение. Проведенный клинический анализ позволил сделать вывод о том, что тонкоигльная аспирационная цитологическая пункционная биопсия является эффективным инструментом диагностики гипоезогенных (кистозных) объемных образований молочной железы с метастазами в щитовидную железу.

Ключевые слова: рак, карцинома, гистология, цитология, аспирационная биопсия

Cherkasova Yu.¹, Zhedrinskaya E.², Sokolova A.¹, Rebrov D.¹, Abdullayeva A.¹, Tsihirova A.¹, Pavlov B.¹ ✉

¹ Institute of Medicine and Health Care of Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russia

² A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Centre, Moscow, Russia

Significance of Cytological Diagnostics by Fine-Needle Aspiration Biopsy in Breast and Thyroid Carcinoma: A Case Report

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: article concept – Cherkasova Yu., Zhedrinskaya E., Pavlov B.; material collection – Rebrov D., Sokolova A., Abdullayeva A.; text writing – Tsihirova A., Pavlov B.; text editing – Pavlov B., Sokolova A.

Submitted: 10.04.2025

Accepted: 24.09.2025

Contacts: bohdanpavlov@yandex.ru

Abstract

Introduction. Breast cancer (BC) is the second most common cancer (after lung cancer), and BC ranks first among all malignant neoplasms (MNO) in women, demonstrating a tendency towards a constant increase in incidence. Breast cancer often metastasizes to distant organs, including the thyroid gland. Among all metastatic thyroid lesions, 7.8% of cases are consequences of breast cancer. Diagnostics of MNO in the mammary and thyroid glands presents certain difficulties. Despite screening programs, there is a high probability of obtaining false-negative diagnostic results. The fine-needle aspiration cytological puncture biopsy (FNACPB) is one of the fast, cheap, effective and comfortable methods for diagnosing palpable and ultrasound-observable lesions of the mammary and thyroid glands.

Purpose. To analyze advantages of aspiration biopsy and cytological method of examining breast tumors with metastases to the thyroid gland.

Materials and methods. The article considers a clinical case of a 61-year-old woman with a volumetric formation in the left mammary gland and a metastatic formation in the right lobe of the thyroid gland.

Results. Despite the false-negative diagnosis of the tumor (according to ultrasound data) during the medical examination, the patient palpated a volumetric lesion in the left mammary gland by herself. Repeated ultrasound revealed a volumetric lesion in the left



mammary gland with a final BI-RADS score of 5, as well as a hypoechoic nodular lesion in the right lobe of the thyroid gland with a TIRADS score of 4. The biopsy (thick needle aspiration) of the left mammary gland with cytological examination and FNACPB of the right lobe of the thyroid gland revealed carcinoma cells in both lesions.

Conclusion. The clinical analysis performed allowed concluding that the fine-needle aspiration cytological puncture biopsy is an effective tool for diagnosing hypoechoic (cystic) volumetric lesions in the mammary gland with metastases to the thyroid gland.

Keywords: cancer, carcinoma, histology, cytology, aspiration biopsy

■ ВВЕДЕНИЕ

В общей структуре злокачественных новообразований (ЗНО) женщин рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место по частоте заболеваемости. Так, в России за 2021 год распространенность РМЖ составила 22,1% от всех ЗНО, а в 2022 году этот показатель достиг 22,4%. За 11 лет (2012–2022 гг.) заболеваемость РМЖ демонстрировала тенденцию к росту (рис. 1). Необычное снижение заболеваемости РМЖ в 2020–2021 годах, вероятно, объясняется пандемией COVID-19, во время которой основные ресурсы здравоохранения были сосредоточены на борьбе с вирусной инфекцией. Смертность от РМЖ в 2022 году достигла 15,8% от числа общей смертности от ЗНО [1, 2].

Причины развития рака молочной железы разнообразны и обсуждаются в контексте воздействия факторов риска, 5–10% случаев РМЖ обусловлены генетической восприимчивостью. Лучше всего описано влияние вариативности генов BRCA1 и BRCA2 на развитие РМЖ [3]. Эстроген-рецептор-позитивные (ER+) опухоли характеризуются худшим прогнозом РМЖ у носителей мутаций BRCA1/BRCA2 [4].

Возраст менархе также влияет на вероятность развития РМЖ. По сравнению с менархе в 13 лет, ≤ 11 -летний возраст менархе положительно связан (ОШ=1,26),

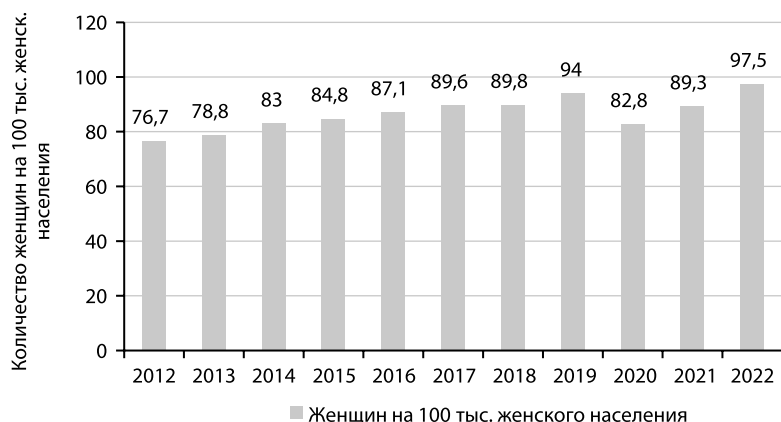


Рис. 1. Заболеваемость РМЖ в период с 2012 по 2022 год в России
Fig. 1. Breast cancer incidence in Russia from 2012 to 2022

а ≥ 16 -летний возраст менархе отрицательно связан ($ОШ=0,13$) с развитием РМЖ в 40-летнем возрасте [5]. Вероятно, такая закономерность ассоциирована с более продолжительным фертильным периодом и, соответственно, – с продолжительной экспозицией высокого уровня эстрогена. Последний оказывает мутагенное/протоонкогенное воздействие, способствуя пролиферации и онкогенезу в ткани молочной железы [6].

Отказ от рождения детей и/или грудного вскармливания, поздние роды существенно повышают риск развития РМЖ. Вероятно, это связано с отсутствием или уменьшением безменструального периода и продолжительным циклическим воздействием высоких концентраций половых гормонов.

Наличие в анамнезе аборт (особенно до первых родов) и прерывание беременности на поздних сроках увеличивают частоту РМЖ впоследствии, что также связано с дисбалансом половых гормонов [7].

Семейный анамнез считается важным фактором риска заболеваемости РМЖ. Этот риск определяется не только самим фактом наличия родственницы с РМЖ, но также степенью родства. Частота РМЖ увеличивается с более высокой степенью родства. Также имеет значение количество случаев с РМЖ в семье (в роду) и возраст заболевших [8]. У женщин в пременопаузе с семейным анамнезом,отягощенным по РМЖ, следует проводить ежегодный скрининг молочных желез [9].

Заболеваемость и смертность от РМЖ у женщин старше 50 лет достоверно выше, чем у более молодых женщин. Скрининг молочной железы с 40 лет позволяет выявить большое количество случаев рака и своевременно начать лечение [10]. Кумуляция случаев РМЖ с возрастом, очевидно, связана с накопительным мутагенным эффектом канцерогенов, гормонов и других биологически активных веществ, которые действуют на протяжении жизни женщины.

Некоторые группы лекарственных препаратов могут способствовать онкогенным процессам в молочной железе. Одним из таких кандидатов является фолиевая кислота, добавка которой (в опытах на животных) способствовала прогрессированию уже существующей опухоли, изменяла экспрессию белков, участвующих в пролиферации и апоптозе (BAX, PARP, HER2). Тем не менее дозозависимого эффекта доказано не было [11].

Опубликованы данные о связи приема комбинированных оральных контрацептивов (КОК) с повышенной частотой РМЖ ($ОШ=1,5$) по сравнению с женщинами, никогда не использовавшими КОК. Связь была сильнее для эстроген-рецептор-положительного (ER+) варианта РМЖ ($ОШ=1,7$) по сравнению с (ER-) -вариантом ($ОШ=1,2$) [12]. В недавнем метаанализе было показано, что риск РМЖ повышен только для КОК, содержащих прогестаген ($ОШ=1,29$) [13].

Имеются веские доказательства связи ожирения с развитием (ER+) -варианта РМЖ у женщин в постменопаузе. Считается, что опухолевый патогенез опосредуется через повышенные уровни инсулина, глюкозы, а также эстрогенов, адипокинов и воспалительных медиаторов жировой ткани. Метаболические пути производства энергии в опухолевых клетках нарушены [14]. Ожирение и повышенный уровень холестерина (через метаболит CYP27A1) являются факторами риска рецидива и метастазирования рака молочной железы [15].

Алкоголь воздействует через активацию ароматазы на синтез эстрогена. Он также влияет на менструальный цикл, потенциально снижая вариабельность



и продолжительность цикла. Предположительно, алкоголь стимулирует развитие РМЖ за счет пожизненного накопления эндогенного эстрогена [16].

Для рассматриваемой патологии характерны отдаленные метастазы в различные органы, включая щитовидную железу (ЩЖ), что представляется актуальной проблемой. Метастазы в ЩЖ наблюдаются у 1–3% пациентов при всех ЗНО. Среди них 7,8% случаев являются следствием метастазов из РМЖ. С момента диагностики РМЖ до обнаружения метастазов в ЩЖ проходит от 2 месяцев до 22 лет, а средний возраст людей с метастазами в ЩЖ составляет 51–55,4 года [17]. Заболеваемость и смертность от рака щитовидной железы (РЩЖ) в 2022 году в России составили соответственно 3,5% и 3,6% [2]. При выявлении патологического очага в ЩЖ возникают трудности в интерпретации микроскопической картины, что требует дополнительных методов диагностики.

Тонкоигольная аспирационная цитологическая пункционная биопсия (ТАЦПБ) является недорогим, простым в исполнении диагностическим методом, не вызывающим значительного дискомфорта у пациентов. Впервые ТАЦПБ была использована в 1930 году в Нью-Йорке Хейесом Мартином и Эдвардом Эллисом, однако широко применяться метод начал лишь в 1950-х годах в скандинавском Каролинском институте для диагностики пальпируемых объемных образований молочной железы. В 1970-х годах ТАЦПБ начала активно практиковаться в клиниках Польши. Биопсия толстой иглой была введена значительно позже – в 1990-х годах, и первоначально ее использовали для клинически немых поражений. Позже показания для этого метода были расширены главным образом из-за способности различать карциному *in situ* и инвазивную карциному [18]. Тем не менее ТАЦПБ не была вытеснена из клинической практики. К ее основным достоинствам относятся: доступность, простота исполнения, дешевизна и, что очень важно, низкий риск осложнений. ТАЦПБ проводят без анестезии, она минимально инвазивна и не вызывает значительного отторжения у пациентов. У пациентов, получающих антикоагулянтную терапию, проведение ТАЦПБ не требует ее отмены. Сам анализ проводится быстро. Метод жидкостной цитологии считается более эффективным (по сравнению с традиционным мазком) и оценивающим большее количество клеточного материала, что уменьшает число ложноотрицательных результатов [19].

Цитологическое исследование полученных посредством ТАЦПБ аспиратов дает возможность с высокой точностью диагностировать опухолевые образования (за исключением фолликулярных новообразований). Метод особенно показан при гипоехогенных (и/или кистозных) узлах с неровными краями и микрокальфикациями. При разных ультразвуковых характеристиках лимфоузлов чувствительность ТАЦПБ (в отношении выявления онкопатологии) может достигать 87%, а специфичность – 100%. Материал забирают под контролем УЗИ [20]. Комбинация методов ТАЦПБ и гистологии существенно повышает диагностическую точность исследования [21]. ТАЦПБ позволяет минимизировать ошибки в диагностике и назначить адекватное лечение [22]. Использование данного метода актуально не только для дифференциации РМЖ, но и для диагностики заболеваний ЩЖ [23]. Несмотря на определяющую роль гистологического и иммуногистохимического анализов, цитологическое исследование не утратило своей значимости в обнаружении опухолевых и неопухолевых изменений различных органов и тканей.

■ ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Анализ преимуществ (по сравнению с рядом других технологий) аспирационной биопсии и цитологического метода исследования опухоли молочной железы с метастазами в щитовидную железу.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения указанной цели в настоящей статье рассматривается клинический случай пациентки с карциномой молочной железы с метастазами в щитовидную железу. Представлены поэтапные диагностические процедуры, позволившие с некоторой задержкой добиться постановки правильного диагноза.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинический случай

Пациентка С., 1961 года рождения, работает врачом ультразвуковой диагностики. При прохождении периодического медицинского осмотра на УЗИ молочных желез от 19.05.2022 состояние обеих молочных желез оценивалось как BI-RADS 2. В течение месяца пациентка самостоятельно пальпаторно обнаружила у себя безболезненное несмещаемое уплотнение в левой молочной железе (ЛМЖ). При повторном УЗИ от 20.06.2022 были выявлены признаки очагового образования левой молочной железы: «на 11 часах» определялось образование неоднородной структуры, гипоехогенное, с неровными и частично нечеткими контурами, размерами 21×24×24 мм. В структуре образования также были обнаружены отдельные гиперэхогенные тяжистые участки.

В режиме компрессионной эластографии образование умеренно жесткое (синезеленого окрашивания, тип 3 по шкале Уэйна). По результатам обследования ЛМЖ итоговая оценка – BI-RADS 5. Измененных лимфоузлов не выявлено.

При проведении трепанобиопсии уплотненного участка левой молочной железы были получены три белесовато-желтых тяжа ткани длиной 0,5–1 см. Согласно протоколу прижизненного патологоанатомического исследования: «в биоптатах ткань молочной железы с полями фиброза и немногочисленными протоковыми структурами, выстланными эпителием, без признаков атипии; доброкачественная ткань молочной железы без признаков злокачественного опухолевого роста» (рис. 2).

Параллельно с УЗИ молочной железы было выполнено УЗИ щитовидной железы. По результатам исследования в нижнем полюсе правой доли выявлено единичное гипоехогенное узловое образование вертикальной ориентации с ровными четкими контурами размерами 5×4×5 мм. Кровоток огибающий и внутриузловой. По результатам исследования итоговая оценка правой доли: TIRADS 4, левой доли – TIRADS 1.

Пациентка, испытывая беспокойство по поводу полученных результатов исследований, настояла на консультации в цитологической лаборатории. С учетом клинической картины была предложена повторная пункция толстой иглой с одновременным цитологическим и гистологическим исследованием полученного образца с целью убедиться, что исследуется один и тот же уплотненный участок молочной железы, и верифицировать образование. Для этого с полученного столбика ткани перед погружением его в фиксирующий формалин были взяты отпечатки для цитологического исследования, в которых найдены полуразрушенные клетки злокачественной опухоли молочной железы.

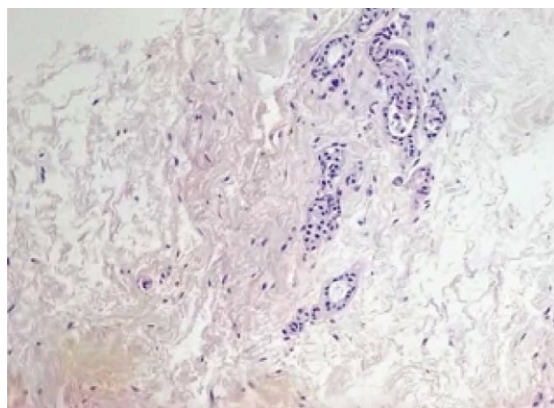


Рис. 2. Микроскопическое описание: в биоптатах ткань молочной железы с полями фиброза и немногочисленными протоковыми структурами, выстланными эпителием без признаков атипии

Примечание: получено с использованием гистологического метода трепан-биопсии очагового образования молочной железы и окрашиванием гематоксилин-эозином, увеличение 10×1,25×10

Fig. 2. Microscopic description: in biopsies, mammary gland tissue with fibrosis fields and a few ductal structures lined with epithelium without signs of atypia

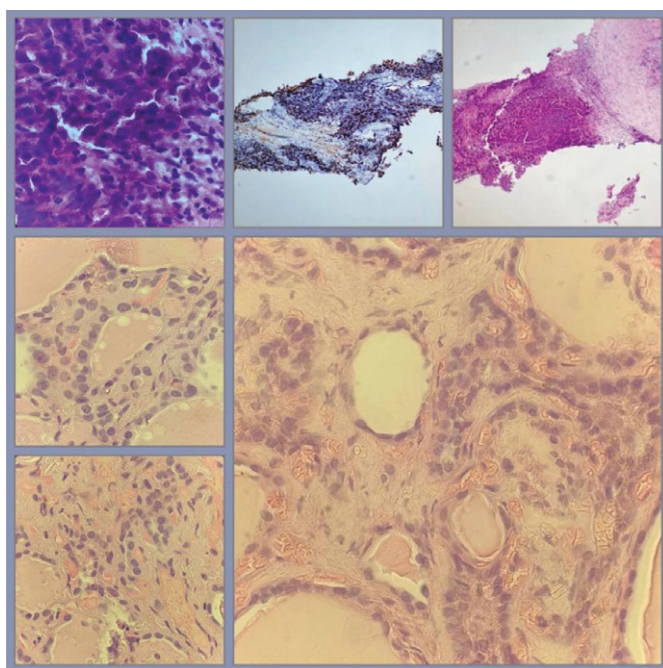


Рис. 3. Гистологический срез, окрашивание гематоксилин-эозином, увеличение 10×1,25×10. Core-биопсия, повторная пункция образования левой молочной железы

Fig. 3. Histological section, hematoxylin and eosin staining, magnification 10×1,25×10. Core biopsy, repeated puncture of the left mammary gland formation

Таким образом, повторная Core-биопсия была признана информативной, материал передан в патологоанатомическое отделение на иммуногистохимическое исследование (рис. 3).

В микроскопической картине цитологического препарата на зернистом белковом фоне («оксифильный диатез») отмечались группы умеренно полиморфных полуразрушенных клеток маммарного эпителия, «притертых» друг к другу узким ободком цитоплазмы, нежносетчатой структурой хроматина, с мелкими периферическими нуклеолами (1–3), редкими эритроцитами, наблюдалась интерпозиция базофильно окрашенного секрета в виде мелких глобул. Цитологическое заключение: «В препаратах № 6468-69/22 очагового образования левой молочной железы выявляется цитологическая картина карциномы. Класс C5 (The Yokohama System, 2018)» (рис. 4).

Параллельно опытным хирургом под УЗ-контролем была выполнена тонкоигольная аспирационная пункция образования в правой доле щитовидной железы. Полученный материал был также окрашен по Паппенгейму – Крюкову и исследован. Характер опухолевого процесса в молочной железе с выраженным злокачественным

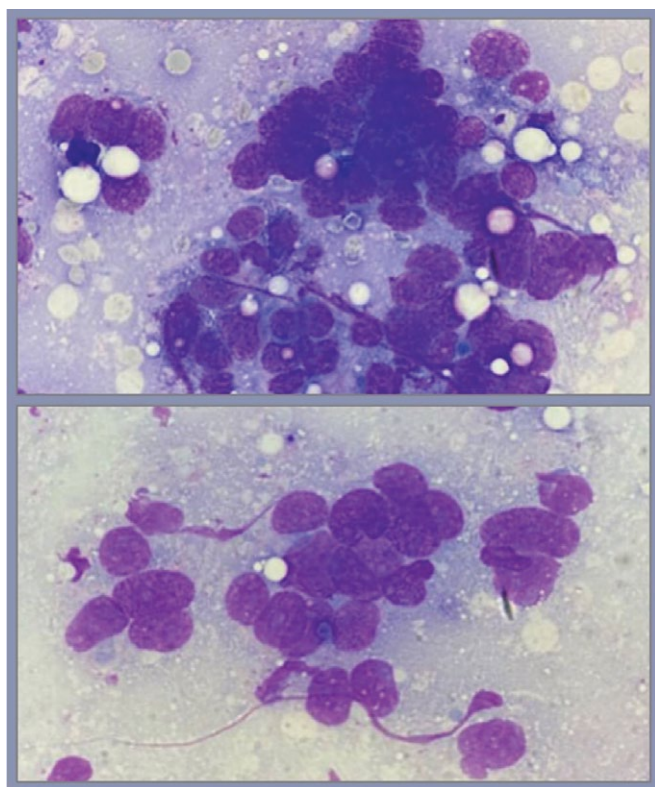


Рис. 4. Цитология, отпечатки трепан-биоптата опухолевого образования молочной железы, окрашивание азур-эозином по Романовскому в модификации Паппенгейма – Крюкова, увеличение 10×1,25×100 (иммерсия)
Fig. 4. Cytology, trephine biopsy prints of a breast tumor, stained with azure-eosin according to Romanovsky in the Pappenheim – Kryukov modification, magnification 10×1.25×100 (immersion)



потенциалом вызывал подозрение на метастатический характер узла в щитовидной железе.

Микроскопическое описание цитологической картины щитовидной железы: единичные папиллярные, оптически плотные структуры опухолевых клеток с гиперхромными, тангенциально расположенными гиперхромными ядрами, с зубчатым ядерным контуром, неравномерно петлистым гетерохроматином, мелкими периферическими нуклеолами, везикуляцией цитоплазмы; в отдельных ядрах отмечаются борозды и нечеткие контуры внутриядерных инклюзий. Цитологическое заключение: «В препаратах №№ 6466-67/22 ТАЦПБ очагового образования правой доли щитовидной железы обнаружены единичные фолликулярные и папиллярные комплексы карциномы, вероятнее, фолликулярный вариант папиллярной карциномы щитовидной железы (внутрицитоплазматические включения не определяются). Класс VI (The Bethesda system, 2017)» (рис. 5).

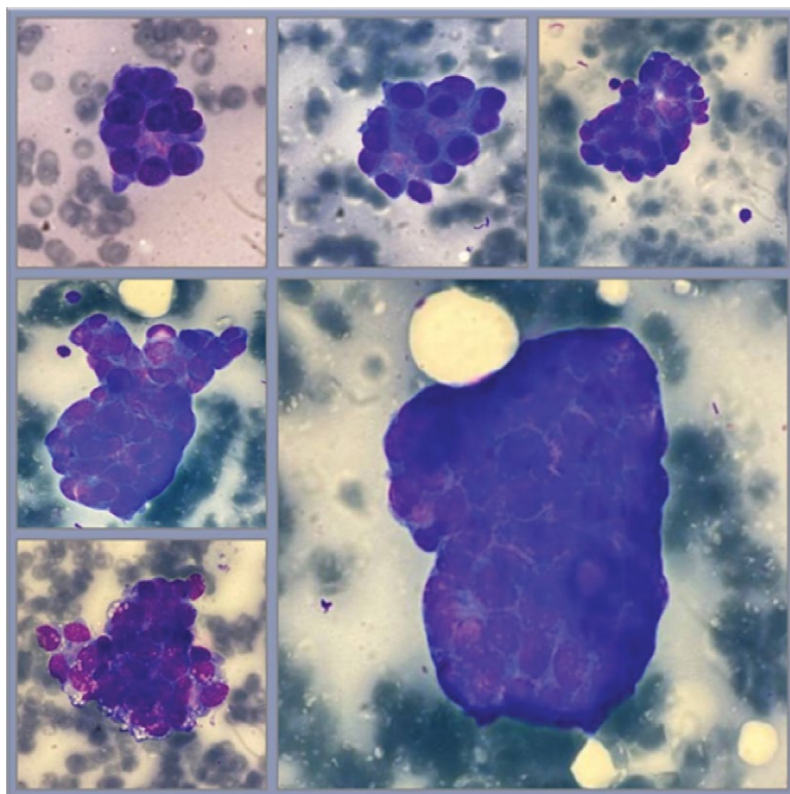


Рис. 5. Цитологическое исследование: тонкоигольная аспирационная биопсия опухолевого образования щитовидной железы, окрашивание азур-эозином по Романовскому в модификации Паппенгейма – Крюкова, увеличение 10×1,25×100 (иммерсия)
Fig. 5. Cytological examination: fine-needle aspiration biopsy of a thyroid tumor, staining with azure-eosin according to Romanovsky in the Pappenheim – Kryukov modification, magnification 10×1.25×100 (immersion)

При цитологической оценке наблюдались определенные сложности, затрудняющие интерпретацию наблюдаемой микроскопической картины, включая:

- скудное количество материала;
- отсутствие в пунктате клеток нормального фолликулярного эпителия ЩЖ;
- сходство строения хроматина в опухолевых клетках узловых образований щитовидной и молочной железы;
- наличие одиночных, эксцентрично лежащих ядрышек;
- отсутствие достоверных морфологических признаков папиллярной карциномы (таких как внутриядерные цитоплазматические включения; практически полное отсутствие коллоида, подтверждающего принадлежность опухолевых клеток к ткани щитовидной железы).

В данной ситуации установить гистогенез образования было очень важно для определения стадирования процесса, тактики ведения пациентки, а повторную тонкоигольную пункцию узла размером менее 5 мм было осуществить крайне сложно из-за отека ткани.

Позднее препараты были пересмотрены в двух референс-центрах (институт им. П.А. Герцена, НИИ эндокринологии) с ответами «атипия неясного значения» и «карцинома, вероятнее всего, метастаз рака молочной железы»).

Цитологическое заключение № 6468-69/22 отпечатков с трепан-биоптата очагового образования левой молочной железы: цитологическая картина карциномы. Пациентка была дополнительно обследована, данных за вторичные изменения метастатического характера не выявлено. Гистологически верифицирован злокачественный характер роста опухоли (клинико-морфологический тип: иммунофенотип более соответствует трижды негативному типу (ER– PR– HER2: 0 – отрицательно, Ki-67: 67%).

УЗИ ОМТ от 19.05.2022: УЗИ-признаки инволютивных изменений матки и яичников.

УЗИ ЩЖ от 20.06.2022: УЗ-признаки единичного узлового образования правой доли щитовидной железы.

КТ ОГК от 24.06.2022: заключение: образование в левой молочной железе. Данных по распространению основного заболевания не получено.

МРТ ГМ от 27.06.2022: заключение: данных за острую и подострую сосудистую патологию нет. Патологического накопления контрастного вещества нет.

Признаки микроангиопатии (Fazekas-1) с немногочисленными очагами глиоза в белом веществе головного мозга. Остаточные признаки этмоидита, двустороннего синусита.

По данным сцинтиграфии костей скелета от 28.06.2022 – без очаговой патологии.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Рак молочной железы является вторым по частоте типом ЗНО среди женщин, и заболеваемость РМЖ год от года постепенно увеличивается. Рак молочной железы стоит на втором месте (после рака легких) в мире по частоте заболеваемости и на четвертом месте по частоте смертности от всех видов рака [24]. На ранних стадиях патологию обнаруживают при проведении скрининга, и маммография является «золотым стандартом» для раннего выявления данного типа рака. Иногда характерные признаки (объемное образование, втянутая кожа, «апельсиновая корка» и др.) позволяют заподозрить РМЖ. Во многих странах существуют программы скрининга для женщин старше 40–50 лет, когда вероятность заболеть раком молочной железы



достоверно возрастает по сравнению с таковой в более молодых группах. Это приводит к положительным результатам, позволяя своевременно начать лечение и добиться благоприятных исходов [25]. Хорошей практикой является самообследование женщины, однако это не всегда помогает запросить соответствующее клиническое обследование во время визита к врачу [26]. По этой причине может наблюдаться существенное запаздывание в диагностике РМЖ, что впоследствии приводит к обширным травмирующим операциям и осложнениям, включая метастазирование и летальные исходы.

В представленном клиническом случае самообследование пациентки послужило импульсом для проведения расширенного онкопоиска. На момент описания случая пациентке был 61 год, то есть она находилась в возрасте «повышенного риска» в отношении рака молочной железы, что соответствует данным источников литературы [27]. Исходя из представленного материала, несмотря на доступность диагностических средств, постановка правильного диагноза была осуществлена с некоторой задержкой. Первичное гистологическое исследование биоптата молочной железы не обнаружило признаков атипии. Онконастороженность пациентки (которая сама была врачом) привела к проведению дополнительных диагностических процедур. В частности, повторное УЗИ молочных желез привело к итоговой оценке BI-RADS 5 (по сравнению с BI-RADS 2 при первоначальном УЗИ) левой молочной железы, указывая на чрезвычайно высокую вероятность злокачественной патологии [28]. УЗИ щитовидной железы позволило оценить состояние правой доли как TIRADS 4, то есть образование среднего риска злокачественности. TIRAD 4, по данным литературы, соответствует 17–75% злокачественности [29].

Дальнейший отбор цитологического/гистологического материала производился прицельно из подозрительных очагов в левой молочной железе и в правой доле щитовидной железы. Цитологическое исследование аспирата из очага левой молочной железы обнаружило полуразрушенные злокачественные клетки, и по итогу микрокопии был сделан вывод о наличии карциномы левой молочной железы.

Тонкоигольная аспирационная цитологическая пункционная биопсия очага в правой доле щитовидной железы позволила обнаружить предположительно фолликулярный вариант папиллярной карциномы щитовидной железы. В конечном итоге сделано предположение о карциноме левой молочной железы с метастазом в правую долю щитовидной железы. Переоценка цитологических препаратов в институте им. П.А. Герцена и НИИ эндокринологии подтвердила первичное предположение и позволила уточнить фенотип опухоли.

Приведенный клинический пример показывает, что в некоторых ситуациях ТАЦПБ может демонстрировать преимущества в быстрой диагностике онкологических заболеваний молочной и щитовидной желез, если аспирация проводилась из подозрительных очагов с высокой оценкой по шкалам BI-RADS и TIRAD. Последние достаточно точно (по картине УЗИ) оценивают вероятные риски злокачественных опухолей в обнаруженных очагах, отличающихся от окружающей ткани.

Предоперационная диагностика опухолевых поражений очень важна для планирования и проведения эффективного лечения. Роль ТАЦПБ в последние годы снизилась по сравнению с толстоигольной биопсией, в том числе по причине того, что в подавляющем большинстве сравнительных исследований ТАЦПБ демонстрирует более низкие значения (с более широкими вариациями) чувствительности

и специфичности по сравнению с толстоигльной биопсией. В настоящее время ТАЦПБ в основном назначается при кистозных образованиях, подозрении на рецидивы и метастазы. Несмотря на ряд преимуществ ТАЦПБ, при получении ложных результатов, требующих дополнительных исследований, итоговый онкопоиск может вылиться в более продолжительную и затратную диагностику [18]. В описанном случае в щитовидной железе определялось полостное (гипоэхогенное) объемное образование, позволяющее выбрать ТАЦПБ в качестве диагностического метода, что привело к определению наличия метастаза в правой доле щитовидной железы.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются серьезной проблемой в области здравоохранения и экономики государств. Рак является причиной примерно одной из шести смертей в целом и одной из четырех смертей от неинфекционных заболеваний во всем мире. Решение этой проблемы связано с существенными социально-экономическими издержками, не говоря об эмоциональных страданиях пациентов и членов их семей. В настоящее время рост средней продолжительности жизни человечества упирается в необходимость преодоления смертности, связанной со злокачественными новообразованиями.

Рак молочной железы демонстрирует значительный рост в последние годы, особенно в развитых странах, что, вероятно, связано с особенностями питания, образа жизни, увеличением ИМТ и др. В бедных государствах основные затруднения в распознавании рака молочной железы связаны с его поздней диагностикой, что увеличивает частоту неблагоприятных исходов. Тревожный рост заболеваемости требует мобилизации усилий на всех уровнях ранней диагностики, профилактики, управления рисками и т. д.

Тонкоигльная аспирационная цитологическая пункционная биопсия в настоящее время является достаточно востребованным методом, хотя существуют ограничения в его применении. В основном его используют для отбора содержимого в полостных (кистозных) образованиях и не применяют для диагностики плотных поражений. Показания к ТАЦПБ в основном определяют по результатам ультразвукового исследования. Аспират применяют для приготовления традиционного мазка либо для препарата жидкостной цитологии.

В приведенном клиническом случае использовали ТАЦПБ с приготовлением традиционного мазка-отпечатка. При микроскопии удалось определить клетки карциномы и идентифицировать метастатическое образование в правой доле щитовидной железы. В данном случае ТАЦПБ оказалась простым в исполнении, дешевым, нетравматичным диагностическим методом, позволившим в краткие сроки установить природу поражения щитовидной железы, выявленного на УЗИ. Хотя аспирацию из объемного образования левой молочной железы осуществляли толстой иглой, цитологическое исследование мазка-отпечатка дало возможность диагностировать первичный очаг карциномы, притом что предшествующая биопсия с гистологическим исследованием не обнаружила патологии.

Проведенный клинический анализ позволил сделать вывод о том, что тонкоигльная аспирационная цитологическая пункционная биопсия является полезным инструментом для онкодиагностики кистозных объемных образований молочной и щитовидной желез.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Association of Oncologists of Russia: official website. Moscow [Electronic source]. Available at: <https://oncology-association.ru/> (accessed 26.04.2023). (in Russian)
2. Khailova Zh., Kapin A., Ivanov S., et al. Results of epidemiological monitoring of mortality, mortality, prevalence of malignant neoplasms based on the current state cancer register. *Manager Zdravoochranenia*. 2024;11:39–51. doi: 10.21045/1811-0185-2024-11-39-51 (in Russian)
3. Saleem M., Ghazali M.B., Wahab M.A.M.A., et al. The BRCA1 and BRCA2 Genes in Early-Onset Breast Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1292:1–12. doi: 10.1007/5584_2018_147
4. Vocka M., Zimovjanova M., Bielikova Z., et al. Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers Versus Non-Carriers. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):738. doi: 10.3390/cancers11060738
5. Yang P.J., Hou M.F., Ou-Yang F., et al. Association of early-onset breast cancer with body mass index, menarche, and menopause in Taiwan. *BMC Cancer*. 2022;22(1):259. doi: 10.1186/s12885-022-09361-2
6. Chesnokova N., Barsukov V. Risk factors of breast cancer development. *Advances in modern natural science*. 2008;1:18–24. (in Russian) Available at: <https://s.natural-sciences.ru/pdf/2008/1/3.pdf>
7. Muranova O. Risk factors of breast cancer. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*. 2007;2:76–77. (in Russian)
8. Brewer H.R., Jones M.E., Schoemaker M.J., et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165(1):193–200. doi: 10.1007/s10549-017-4325-2
9. Han Y., Moore J.X., Colditz G.A., et al. Family History of Breast Cancer and Mammographic Breast Density in Premenopausal Women. *JAMA Netw Open*. 2022;5(2):e2148983. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.48983
10. Duffy S.W., Vulkan D., Cuckle H., et al. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality (UK Age trial): final results of a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(9):1165–1172. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30398-3
11. Manshadi D.S., Ishiguro L., Sohn K.J. et al. Folic acid supplementation promotes mammary tumor progression in a rat model. *PLoS One*. 2014;9(1):e84635. doi: 10.1371/journal.pone.0084635
12. Beaber E.F., Buist D.S.M., Barlow W.E. et al. Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. *Cancer Res*. 2014;74(15):4078–89. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3400
13. Fitzpatrick D., Pirie K., Reeves G., Green J., Beral V. Combined and progestagen-only hormonal contraceptives and breast cancer risk: A UK nested case-control study and meta-analysis. *PLoS Med*. 2023;20(3):e1004188. doi: 10.1371/journal.pmed.1004188
14. Brown K.A. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(6):350–363. doi: 10.1038/s41574-021-00487-0
15. Baek A.E., Yu Y.A., He S., et al. The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):864. doi: 10.1038/s41467-017-00910-z
16. Shertaeva A., Ospanova D., Grzhibovsky A. Breast cancer risk factors. *Science & Healthcare*. 2022;24(2):167–174. (in Russian)
17. Ognorubov N., Antipova T., Palkina E. Synchronous thyroid gland metastases from breast cancer. Case reports. *Journal of Modern Oncology*. 2021;23(2):280–286. doi: <https://doi.org/10.26442/18151434.2021.2.200934>. (in Russian)
18. Łukasiewicz E., Ziemięcka A., Jakubowski W., et al. Fine-needle versus core-needle biopsy - which one to choose in preoperative assessment of focal lesions in the breasts? Literature review. *J Ultrason*. 2017;17(71):267–274. doi: 10.15557/JoU.2017.0039
19. Karakas H.M., Bicer G., Findik O., et al. Comparison of Two Different Methods of Fine Needle Aspiration Biopsy and Histopathology for Thyroid Nodules. *Cureus*. 2020;12(1):e6740. doi: 10.7759/cureus.6740
20. Feldkamp J., Führer D., Luster M., et al. Fine Needle Aspiration in the Investigation of Thyroid Nodules. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(20):353–9. doi: 10.3238/arztebl.2016.0353
21. Nagai T., Ishida K., Machida H., et al. Usefulness of cytological diagnosis in pancreatic endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration or biopsy: Comparison with histological diagnosis and relationship with puncture route and sample acquisition method. *Diagn Cytopathol*. 2023;51(8):467–474. doi: 10.1002/dc.25144
22. Belyaeva A., Sobolev Yu. The role of fine-needle aspiration puncture biopsy under ultrasound navigation control in differential diagnostics of formations in mammary gland tissues. *Almanac of young science*. 2020;3(38):19–23. (in Russian)
23. Kondratieva T. Fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of thyroid cancer. *Russian Journal of Oncology*. 2019;24(1–2):56–57. (in Russian)
24. Bray F., Laversanne M., Sung H., et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):229–263. doi: 10.3322/caac.21834
25. Kashyap D., Pal D., Sharma R., et al. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int*. 2022;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439
26. Pinheiro C.P.O., Silva R.M.D., Brasil C.C.P., Bezerra I.C., Cavalcante A.N.M., Alexandre A.V., Cruz C.A. Procrastination in the early detection of breast cancer. *Rev Bras Enferm*. 2019;72(suppl 3):227–234. doi: 10.1590/0034-7167-2018-0547
27. Parks R.M., Alfarsi L.H., Green A.R., et al. Biology of primary breast cancer in older women beyond routine biomarkers. *Breast Cancer*. 2021;28(5):991–1001. doi: 10.1007/s12282-021-01266-5
28. He T., Shi T., Luo W., et al. The diagnostic value of BI-RADS grade 3 to 5 for breast masses is correlated with the expression of estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor-2. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(26):e33208. doi: 10.1097/MD.00000000000033208
29. Zhuang Y., Li C., Hua Z., et al. A novel TIRADS of US classification. *Biomed Eng Online*. 2018;17(1):82. doi: 10.1186/s12938-018-0507-3

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ, ПЛАНИРУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЮ В ЖУРНАЛАХ ИЗДАТЕЛЬСТВА «ПРОФЕССИОНАЛЬНЫЕ ИЗДАНИЯ»

С подробной версией и примерами оформления статьи можно ознакомиться на сайте **recipe.by**.

В журнале публикуются оригинальные статьи, описания клинических наблюдений, лекции и обзоры литературы.

Журнал рассматривает материалы от аспирантов, соискателей, докторантов, специалистов и экспертов.

Представление статьи в журнал подразумевает, что:

- статья не была опубликована ранее в другом журнале;
- статья не находится на рассмотрении в другом журнале;
- все соавторы согласны с публикацией текущей версии статьи.

Перед отправкой статьи на рассмотрение убедитесь, что в файле (файлах) содержится вся необходимая информация на русском и английском языках, указаны источники информации, размещенной в рисунках и таблицах, все цитаты оформлены корректно.

Параметры форматирования: Times New Roman, кегль – 12, междустрочный интервал – 1,5. Объем оригинального исследования, описания клинического случая – 30 000 знаков с пробелами (15–17 страниц), обзора, лекции – 50 000 знаков с пробелами (20–25 страниц). Количество рисунков и таблиц – не более 5 для каждой позиции. Количество литературных источников: для оригинального исследования, описания клинического случая – не более 30, обзора, лекции – не более 50. Допускается 10–15%-е отклонение от заданных объемов.

На титульном листе статьи размещаются (на русском и английском языках):

I. Имя автора (авторов)

На русском языке при указании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С.).

На английском языке при указании авторов статьи используется формат «Имя, инициал отчества, фамилия» (Ivan I. Ivanov). Фамилию на английском языке необходимо указывать в соответствии тем, как она была указана в ранее опубликованных статьях, или использовать стандарт BSI.

II. Информация об авторе (авторах)

В этом разделе перечисляются звание, должность, иные регалии. Здесь также указываются e-mail и телефон ответственного автора.

III. Аффiliation автора (авторов)

Аффiliation включает в себя официальное название организации, включая город и страну. Авторам необходимо указывать все места работы, имеющие отношение к проведению исследования.

Если в подготовке статьи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо указать принадлежность каждого автора к конкретному учреждению с помощью надстрочного индекса.

Необходимо официальное англоязычное название учреждения для блока информации на английском языке.

IV. Название статьи

Название статьи на русском языке должно соответствовать содержанию статьи. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию.

V. Аннотация

Рекомендуемый объем структурированной аннотации для оригинальных исследований: 1000–2000 знаков с пробелами. Аннотация содержит следующие

разделы: Цель, Методы, Результаты, Заключение. Для обзорных статей и описаний клинических случаев требований к структуре резюме нет, его объем должен составлять не менее 1000 знаков с пробелами.

В аннотацию не следует включать впервые введенные термины, аббревиатуры (за исключением общеизвестных), ссылки на литературу.

VI. Ключевые слова

5–7 слов по теме статьи. Желательно, чтобы ключевые слова дополняли аннотацию и название статьи.

VII. Благодарности

В этом разделе указываются все источники финансирования исследования, а также благодарности людям, которые участвовали в работе над статьей, но не являются ее авторами.

VIII. Конфликт интересов

Автор обязан уведомить редактора о реальном или потенциальном конфликте интересов, включив информацию о конфликте интересов в соответствующий раздел статьи. Если конфликта интересов нет, автор должен также сообщить об этом. Пример формулировки: «Конфликт интересов: не заявлен».

Текст статьи

В журнале принят формат IMRAD (Introduction, Methods, Results, Discussion; Введение, Методы, Результаты, Обсуждение).

Рисунки

Рисунки должны быть хорошего качества, пригодные для печати. Все рисунки должны иметь подписанные подписи. Подписи должны быть переведены на английский язык.

Таблицы

Таблицы должны быть хорошего качества, пригодные для печати. Обязательны таблицы, пригодные для редактирования, а не отсканированные или в виде рисунков. Все таблицы должны иметь заголовки. Название таблицы должно быть переведено на английский язык.

Список литературы

В журнале используется Ванкуверский формат цитирования, который подразумевает отсылку на источник в квадратных скобках и последующее указание источников в списке литературы в порядке упоминания: [6].

При описании источника следует указывать его DOI, если его можно найти (для зарубежных источников удается это сделать в 95% случаев).

В ссылках на статьи из журналов должны быть обязательно указаны год выхода публикации, том и номер журнала, номера страниц.

В описании каждого источника должны быть представлены не более 3 авторов.

Ссылки должны быть верифицированы, выходные данные проверены на официальном сайте.

Списки литературы приводятся только на английском языке, без транслитерации. После описания русскоязычного источника в конце ссылки ставится указание на язык работы: (in Russian).

Для транслитерации имен и фамилий авторов в русскоязычных источниках, названий журналов следует использовать стандарт BSI.

Редакция журнала ведет переписку с ответственным (контактным) автором.

Редакция вправе отклонить статью без указания причины.