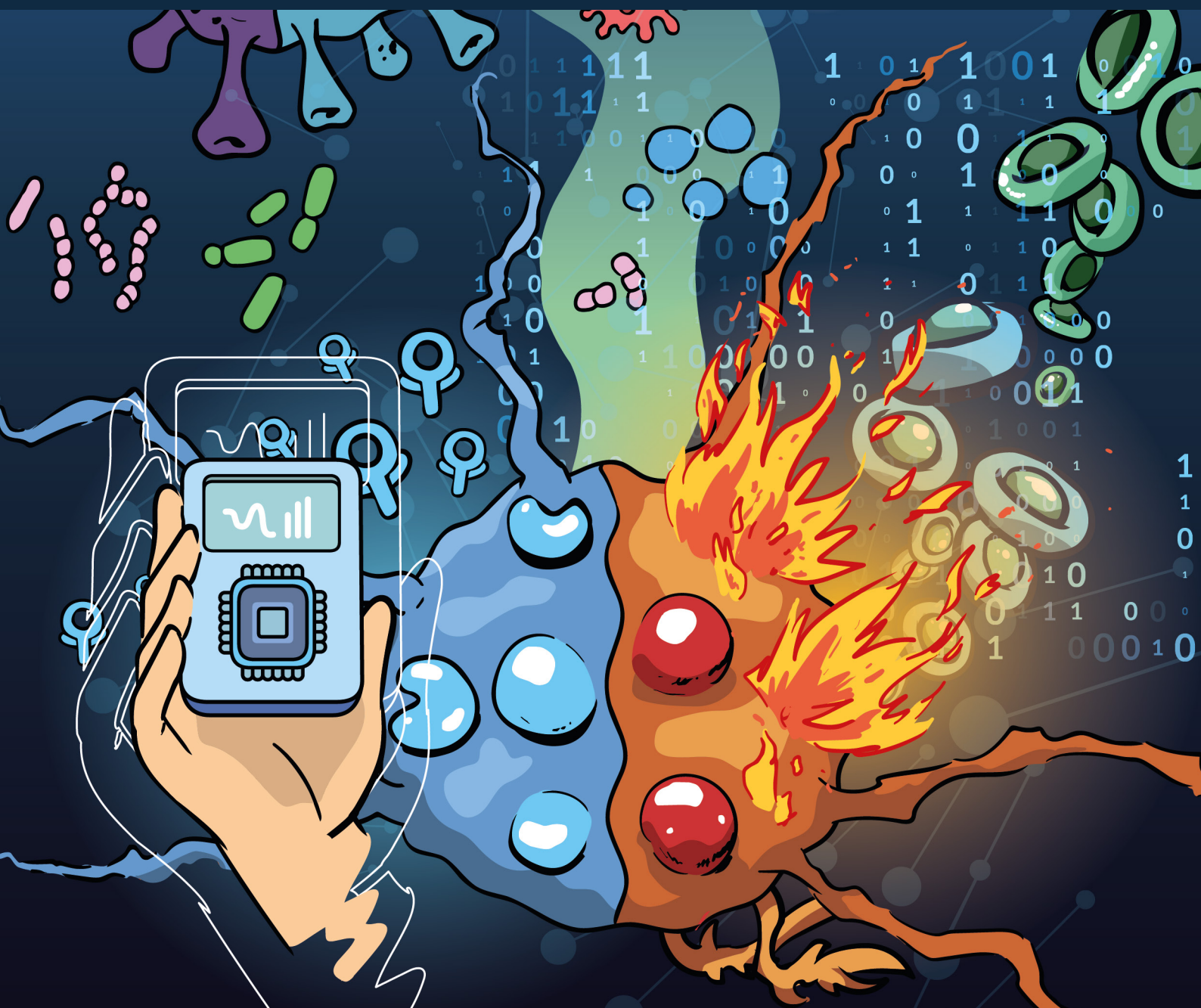




СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

2025 • $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$ 1 • № 2

ADVANCED TARGETS
IN BIOMEDICINE

ISSN 3033-6740 (Online)

БФУ БАЛТИЙСКИЙ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА

IKBFU IMMANUEL KANT
BALTIM FEDERAL
UNIVERSITY

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

2025 • $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$ 1 • № 2

ADVANCED TARGETS IN BIOMEDICINE

Калининград
Издательство Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта
2025

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Л. С. Литвинова, д-р мед. наук, проф., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта — главный редактор (Калининград, Россия)
(AuthorID Scopus: 7007068521, <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>, ResearcherID: A-9672-2014)

Д. Аточин, д-р наук (биомедицина), Гарвардская медицинская школа (Бостон, США)
(AuthorID Scopus: 6603545685, <https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>)

А. Г. Гончаров, канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)
(AuthorID Scopus: 57196504924; <https://orcid.org/0000-0001-6967-8838>)

А. Даринскас, д-р наук (биомедицина), Институт онкологии, Вильнюсский университет (Вильнюс, Литва)
(AuthorID Scopus: 8283876800; ResearcherID: HIY-8525-2022)

Р. В. Деев, канд. мед. наук, доц., первый заместитель директора НИИ морфологии человека им. акад. А. П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б. В. Петровского, руководитель Лаборатории морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата, заведующий кафедрой гистологии Медицинского университета Петровского (Москва, Россия)
(AuthorID Scopus: 58898845100, <https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>, ResearcherID: L-1658-2015)

И. Н. Лаврик, д-р наук (естественные науки), проф., Университет им. Отто фон Герике (Магдебург, Германия)
(AuthorID Scopus: 6603297587; <https://orcid.org/0000-0002-9324-309X>; ResearcherID: C-1700-2009)

М. Ю. Маслов, д-р мед. наук, ведущ. науч. сотр., отделение болезней сердечно-сосудистой системы и метаболизма, Novartis Pharmaceuticals (Кембридж, США)
(AuthorID Scopus: 7003427081; ResearcherID: HIY-8525-2022)

С. Новицкий, д-р наук (биомедицина), ведущ. науч. сотр., отделение онкологии, Amgen Inc. (Южный Сан Франциско, США)
(AuthorID Scopus: 17344280000; ResearcherID: DJI-2306-2022)

Ю. Л. Орлов, д-р биол. наук, проф., Институт цифрового биодизайна и моделирования живых систем, Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (Москва, Россия)
(AuthorID Scopus: 7102256498, <https://orcid.org/0000-0003-0587-1609>, ResearcherID: F-1520-2013)

В. В. Рафальский, д-р мед. наук, проф., Институт медицины и наук о жизни, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)
(AuthorID Scopus: 15023010400, <https://orcid.org/0000-0002-2503-9580>, ResearcherID: G-3172-2013)

Г. Б. Сухоруков, канд. физ.-мат. наук, проф., Сколковский институт науки и технологий (Москва, Россия)
(AuthorID Scopus: 7006255547; ResearcherID: J-8338-2013)

П. В. Федурев, канд. биол. наук, доц., Институт медицины и наук о жизни, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)
(AuthorID Scopus: 56663288700, <https://orcid.org/0000-0002-7577-6132>, ResearcherID: T-3035-2018)

И. А. Хлусов, д-р мед. наук, проф., рук. Лаборатории клеточных и микрофлюидных технологий, Сибирский государственный медицинский университет (Томск, Россия)
(AuthorID Scopus: 7004826401; <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>, ResearcherID: A-4945-2014)

К. А. Юрова, д-р мед. наук, ст. науч. сотр., Центр иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта (Калининград, Россия)
(AuthorID Scopus: 56520441800, <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>, ResearcherID: F-7614-2017)

Учредитель

Балтийский федеральный университет им. И. Канта

Редакция

236016, Россия, Калининград, ул. А. Невского, 14

Издатель

236016, Россия, Калининград, ул. А. Невского, 14

Журнал издаётся с 2025 г. Периодичность: 2 выпуска в год.
Индексируется в РИНЦ

EDITORIAL BOARD

Prof. Larisa S. Litvinova, Dr. habil. (Medicine), Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia — Editor-in-chief
(AuthorID Scopus: 7007068521, <https://orcid.org/0000-0001-5231-6910>, ResearcherID: A-9672-2014)

Prof. Dmitriy Atochin, Dr. habil. (Biomedicine),
Assistant Professor, Harvard Medical School, USA
(AuthorID Scopus: 6603545685, <https://orcid.org/0000-0002-2405-2070>)

Adas Darinskas, PhD (Biomedicine), Institute of Oncology, Vilnius University, Lithuania
(AuthorID Scopus: 8283876800; ResearcherID: HIY-8525-2022)

Prof. Roman V. Deev, MD, PhD (Medicine), First Deputy Director of the A. P. Avtsyn Human Morphology Research Institute, of the FSBS B. V. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Head of the Laboratory of Morphology and Pathology of the Musculoskeletal System, Head of the Department of Histology, Petrovsky Medical University, Russia
(AuthorID Scopus: 58898845100, <https://orcid.org/0000-0001-8389-3841>, ResearcherID: L-1658-2015)

Prof. Andrei G. Goncharov, PhD (Medicine), Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia
(AuthorID Scopus: 57196504924; <https://orcid.org/0000-0001-6967-8838>)

Pavel V. Feduraev, PhD (Biology), Associate Professor, Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia
(AuthorID Scopus: 56663288700, <https://orcid.org/0000-0002-7577-6132>, ResearcherID: T-3035-2018)

Prof. Igor A. Khlusov, MD, Dr. habil. (Medicine), Head of the Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Russia
(AuthorID Scopus: 7004826401; <https://orcid.org/0000-0003-3465-8452>, ResearcherID: A-4945-2014)

Prof. Inna Lavrik, Dr. habil. (Natural Sciences),
Otto von Guericke University Magdeburg, Germany
(AuthorID Scopus: 6603297587; <https://orcid.org/0000-0002-9324-309X>; ResearcherID: C-1700-2009)

Mikhail Maslov, Dr. habil. (Medicine), Principal Scientist, Novartis Pharmaceuticals, USA
(AuthorID Scopus: 7003427081; ResearcherID: HIY-8525-2022)

Sergey V. Novitskiy, Dr. habil. (Biomedicine),
Principal Scientist, Oncology Department, Amgen Inc., USA
(AuthorID Scopus: 17344280000; ResearcherID: DJI-2306-2022)

Prof. Yuriy L. Orlov, Dr. habil. (Biology), Institute of Digital Design and Simulation of Living Systems, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Russia
(AuthorID Scopus: 7102256498, <https://orcid.org/0000-0003-0587-1609>, ResearcherID: F-1520-2013)

Prof. Vladimir V. Rafalskiy, Dr. habil. (Medicine), Institute of Medicine and Life Sciences, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia
(AuthorID Scopus: 15023010400, <https://orcid.org/0000-0002-2503-9580>, ResearcherID: G-3172-2013)

Prof. Gleb B. Sukhorukov, PhD (Physics, Mathematics),
Skolkovo Institute of Science and Technology, Russia
(AuthorID Scopus: 7006255547; ResearcherID: J-8338-2013)

Kristina A. Yurova, Dr. habil. (Medicine), Senior Researcher, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia
(AuthorID Scopus: 56520441800, <https://orcid.org/0000-0001-6146-3330>, ResearcherID: F-7614-2017)

Founders

Immanuel Kant Baltic Federal University

Address

14 A. Nevskogo St., Kaliningrad, Russia, 236016

Editorial Office

14 A. Nevskogo St., Kaliningrad, Russia, 236016

The journal has been published since 2025. Publication frequency: 2 issues per year.
Indexed in the Russian Science Citation Index

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Раев М. Б.</i> Эволюционный путь иммунодиагностических систем	7
<i>Носарева О. Л., Степовая Е. А., Литвинова Л. С., Юрова К. А., Спирина Л. В.</i> Роль белков теплового шока 27 и 70, убиквитина в окислительной модификации протеинов и реализации дексаметазон-индуцированного апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в условиях ингибирования белка теплового шока 27	31
<i>Артемьев И. А., Акино А. Д., Дрейзис И. И., Тирикова П. В., Дунаева Р. Д., Центр Е. В., Рубинштейн А. А., Головкин А. С., Кудрявцев И. В., Маслянский А. Л.</i> Нарушения субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови при аксиальном спондилоартрите.....	42
<i>Полуян О. С., Костюк С. А., Ревтович М. Ю.</i> Молекулярно-биологическая характеристика бактериальных агентов — этиологических факторов кератитов и язв роговицы.....	58
<i>Марченко В. С.</i> Особенности системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусной инфекцией.....	77
<i>Гордунов Г. А., Минеева И. В.</i> Синтез новых 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-онов: оптимизация условий синтеза и анализ биоактивности полученных соединений	89

CONTENTS

<i>Rayev M. B.</i> Main stages of immunoassay methods evolutionary development.....	7
<i>Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Litvinova L. S., Yurova K. A., Spirina L. V.</i> Role of heat shock proteins 27 and 70, and ubiquitin in oxidative modification of proteins, and the implementation of dexamethasone-induced apoptosis of jurkat tumor cells the conditions of inhibited heat shock proteins 27.....	31
<i>Artemiev I. A., Aquino A. D., Dreizis I. I., Tirikova P. B., Dynaeva R. D., Centr E. V., Rubinstein A. A., Golovkin A. S., Kudryavtsev I. V., Maslyanskiy A. L.</i> Alterations in peripheral blood regulatory T cell subsets in patients suffering from axial spondyloarthritis.....	42
<i>Poluyan O. S., Kostiuk S. A., Revtovich M. Yu.</i> Molecular biological characteristics of bacterial agents — etiological factors of keratitis and corneal ulcers.....	58
<i>Marchenko V. S.</i> Features of the complement system and phagocytic activity of neutrophils in patients with post-covid syndrome and herpesvirus infection.....	77
<i>Hardunou R. A., Mineyeva I. V.</i> Synthesis of new 3,4-dihydropyrimidin-2(1h)-ones: optimisation of synthesis conditions and analysis of antifungal activity of the obtained compounds.....	89

Уважаемые коллеги, читатели и друзья журнала!



Артём Викторович Пунгин

Перед вами — выпуск, который мы посвящаем памяти нашего коллеги, ученого и педагога Артёма Викторовича Пунгина. Его безвременный уход стал тяжелой потерей для научного сообщества, для всех, кто знал его как талантливого исследователя, вдумчивого преподавателя и яркого человека.

Артём Викторович воплощал в себе те принципы, на которых строится наше издание: глубина междисциплинарного подхода, стремление к синтезу фундаментального знания и прикладных решений, искренняя увлеченность наукой на стыке молекулярной биологии, биоинженерии и экологии. Его работа — часть того общего поиска, который ве-

дет научное сообщество к созданию новых биотехнологических стратегий, а также подходов, способных улучшить качество жизни человека.

Этот выпуск не только собрание статей, отражающих актуальные тренды в биомедицине. Это также символический жест уважения и признания вклада Артёма Викторовича в наше общее дело. Мы видим в нем отражение его научных интересов и того широкого профессионального диалога, который он поддерживал с коллегами.

Публикуемые здесь исследования — от фундаментальных работ до прикладных разработок — продолжают линию, к которой Артём Викторович был причастен: линию поиска, критического анализа и инноваций. Каждая статья, прошедшая строгий отбор и рецензирование, представляет собой шаг вперед в понимании сложных биомедицинских задач, и мы уверены, что такой вклад в науку был бы для Артёма Викторовича наилучшей памятью.

Мы благодарим авторов, рецензентов и редакторов, принявших участие в подготовке этого выпуска. Особые слова признательности — коллегам Артёма Викторовича, чьи работы помогают сохранить его научное наследие.

Пусть этот выпуск станет не только источником новых знаний для специалистов, но и напоминанием о том, что наука создается людьми — увлеченными, преданными своему делу и навсегда оставляющими след в сердцах тех, кто продолжает этот непростой путь.

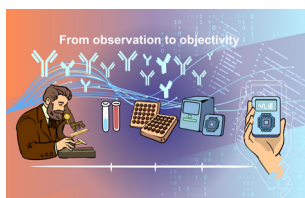
Редакция журнала «Современные направления в биомедицине»



Review, Communication

MAIN STAGES OF IMMUNOASSAY METHODS EVOLUTIONARY DEVELOPMENT

M. B. Rayev*



Laboratory of Cellular Immunology
and Nanobiotechnology, «Institute of Ecology
and Genetics of Microorganisms
of the Russian Academy of Sciences» — branch
of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,
614081, Perm, Russia

* Correspondence: mraev@iegm.ru

To cite this article:

Rayev M. B. Main stages of immuno-
assay methods evolutionary develop-
ment. *Advanced targets in Biomedicine*.
2025;1(2):7—30.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-1>

Received
29.04.2025
Revised
12.06.2025
Accepted
01.09.2025
Published
08.12.2025

© Rayev M. B., 2025

Abstract: The evolutionary pathway of diagnostic testing methods can be traced through the historical development and refinement of analytical tools. These tools are designed to identify sources, decipher mechanisms, and control processes inseparable from functional and morphological organization of living organisms under both normal and pathological conditions. In essence, this pathway represents a shift from subjective observation to objective formalization. The importance of this transition has been long recognized and is difficult to overestimate, as illustrated by the consequences of reckless human interference with nature. Furthermore, analysis of the global diagnostic systems market indicates significant growth: valued at USD 14.51 billion in 2021, it is forecast to reach USD 25.88 billion by 2029 (Data Bridge Market Research). The diversity of approaches to developing immunodiagnostic methods, as well as to biomedical analytics in general, is vast. Researchers continue to generate new methodologies. Accordingly, this review analyzes the evolutionary pathways of immunoassay techniques and tools that are actively applied in both laboratory and point-of-care testing.

Keywords: antibody, antigen, serological test, agglutination, immunoassay, affinity, enzyme-linked immunosorbent assay



Обзор

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ПУТЬ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

М. Б. Раев*

Лаборатория клеточной иммунологии
и нанобиотехнологии, «Институт экологии
и генетики микроорганизмов,
Уральское отделение Российской
академии наук» — филиал
Пермского федерального исследовательского центра,
Уральское отделение Российской академии наук,
614081, Россия, Пермь

* Автор-корреспондент: mraev@iegm.ru

Для цитирования:

Раев М. Б. Эволюционный путь
иммунодиагностических систем.
Современные направления в биомеди-
цине. 2025;1(2):7—30.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-1>

Поступила
29.04.2025 г.
Прошла рецензирование
12.06.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Раев М. Б., 2025

Резюме: Эволюционный путь развития методов диагностического тестирования по существу сводится к истории, связанной с разработкой и совершенствованием инструментов, позволяющих выявить источники, расшифровать механизмы, проконтролировать течение процессов, неотделимых от функционально-морфологической организации и/или состояния живых организмов, причем не только в патологии, но и в норме. По сути это путь от субъективного наблюдения к объективной формализации. Пути и значимость совершенствования последней долго перечислять и трудно переоценить. Достаточно обратить внимание на последствия недальновидно реализованного вмешательства человека в природу и на все, что с этим связано. Кроме того, о многом говорит анализ роста мирового рынка диагностических систем, который фиксирует 14,51 млрд долл. США в 2021 г. и его прогнозируемый рост к 2029 г. — 25,88 млрд долл. США (Data Bridge Market Research). В силу значительного количества методов диагностического тестирования в представленном обзоре при описании эволюционного пути способов и инструментов иммуноанализа обращают на себя внимание лишь те, которые задействованы в реальной практике лабораторного и внелабораторного тестирования.

Ключевые слова: антитела, антигены, серодиагностика, иммуноанализа, глутининация иммуно-ферментный анализ, аффинность

Applications of analytical tools range from the diagnosis of plant and animal diseases and the monitoring of human health (including both pathological processes and somatic conditions), to the testing of biological specimens in field and in laboratory settings, to the study of natural disasters and the consequences of active human interference with the environment (wars, ecological disasters, etc.). These tools underpin the methodologies used to objectively evaluate phenomena associated with living organisms.

Immune-analytical systems currently dominate global diagnostic sales. At the same time, growing attention is being paid to nucleic acid fragment detection tests, flow cytometry (which enables simultaneous assessment of a broad range of indicator factors), and various systems suitable for in situ analysis. As diagnostic equipment develops and becomes increasingly complex, there is a need for more research into improving the stability and shelf life of analysis reagents. This is particularly important under diverse environmental conditions, including variations in temperature and humidity. Equally important is minimizing reagent consumption per test, a requirement that extends beyond instrumentally arranged systems [1].

Every story has its beginning

When, in 1890, von Behring and Kitasato obtained antiserum against diphtheria and tetanus toxins and demonstrated its neutralizing properties, few could have anticipated that this would mark the dawn of the serological research era. Their work paved the way to systematic studies of antibody properties and their role in bacterial infections. The diagnostic value of antibody detection was soon confirmed for diseases such as typhoid fever [2] and syphilis [3]. Yet the use of antibodies—originally identified as a key defense mechanism against infection—extended beyond infectious disease diagnosis.

Specificity is a defining feature of antigen-antibody interaction. This became the foundation not only for studying microorganism cell antigens but also for detecting a wide range of molecules, including those with a molecular weight above 5000 Da. It has been demonstrated that smaller molecules (haptens) cannot, on their own, induce the production of specific antibodies. However, when conjugated to a larger carrier (e. g., bovine serum albumin), they can elicit antibody production with the required specificity [4].

In 1930, Karl Landsteiner received the Nobel Prize for his discovery of human blood groups identification, work that began in 1900 when he first described the agglutination of red blood cells in one person caused by the serum of another individual. Immunoassay, as an empirical method for antigen study, rested on two fundamental insights: the specificity of antibodies, and the quantitative character of antibody-antigen interactions. It was demonstrated [5] that the ability of antiserum to precipitate soluble antigens represents a quantitative reaction of antibody-antigen interaction. This was demonstrated using *Vibrio cholerae* culture medium, described in the late 19th century [6].

The basis of analysis is specificity! But what is the basis of specificity?

In his pioneering paper on the quantitative evaluation of diphtheria antiserum, Paul Ehrlich formulated fundamental principles of antibody formation and specificity [7]. His work laid the foundation for immunochemistry development, and outlined approaches to studying quantitative antigen-antibody interactions. Later, Heidelberger introduced methods for quantitatively evaluating precipitation. He also became the first to obtain a purified antibody product.

The polyvalent specificity of antisera results in antigen precipitation, which became the foundation for modern immunoassay methods. Antibodies in antiserum bind to multiple antigenic determinants on complex antigens, forming a three-dimensional precipitate lattice that sediments when optimal antigen-antibody concentration ratios are reached. Although this principle was established in theory [8], it could not be applied in practice even in simple immunoassay methods with single-antigen systems. This limitation was overcome when researchers showed that diffusion of antibodies and antigens in the liquid phase across the surface of adjoining agar gels could be used to evaluate their relative concentrations by the location of precipitation bands [9]. This breakthrough led to the development of the double-immunodiffusion assay in gel, which, with minor modifications, remains widely used today [10; 11]. For the first time, this method enabled the characterization of antigenic interaction between molecules and the assessment of antiserum specificity.

Subsequent innovations led to the development of immunoelectrophoresis technology [12], followed by quantitative radial immunodiffusion assays [13]. The discovery of antigen electrophoretic migration in gels in complex with antibody precipitation formed the basis for the development of rocket immunoelectrophoresis method [14], which allowed rapid quantification of individual antigens in mixtures using monospecific antibodies incorporated into gels. A further modification, two-dimensional (crossed) immunoelectrophoresis, made it possible to perform both qualitative and quantitative analysis of complex antigen mixtures using polyspecific antisera.

Gel precipitation methods played a significant role in antigen analysis and quantification, and were widely used to assess antibody specificity and determine precipitating antibody titers. However, their sensitivity rarely exceeded 5 µg/ml, and they could not be applied to quantify low molecular weight antigens that formed only soluble complexes. These limitations spurred the development of alternative approaches to antigen quantification.

In 1945, Coombs and colleagues introduced an assay [15] first described by C. Moreschi in 1908, in which antihuman immunoglobulin antiserum induced the agglutination of erythrocytes (EA) coated with the corresponding immunoglobulins. This reaction, later known as the Coombs antiglobulin test, became an important clinical tool. Additionally, Coombs was the first to use erythrocytes as an indicator system in immunoassays, paving the way for the creation of numerous erythrocyte-based diagnostic methods [16; 17].

Erythrocytes can bind not only antibodies specific to their membrane antigens (direct tests) but also antibodies targeting antigen-coated erythrocytes (indirect or passive tests). This principle gave rise to additional methods, such as the antigen-coated erythrocyte agglutination assay [18–23]. In both direct and indirect quantitative hemagglutination tests, an erythrocytes suspension is added to serial dilutions of antiserum. If a given dilution contains enough agglutinating antibodies to cross-link surface antigens on neighboring erythrocytes, the cells clump together, or agglutinate; otherwise, they settle to the bottom of the wells in a microtiter plate, forming a compact plaque. The titration endpoint, or serum titer, is defined as the highest dilution that still causes erythrocyte agglutination. For their time, hemagglutination tests represented a major breakthrough in immunodiagnostics, offering high sensitivity, specificity, and technical simplicity.

Further progress came in the late 1970s and early 1980s with the development of the erythroimmunoabsorption method (EIA) [24–26]. This approach relied on a simple detection system where erythrocytes served as a visual indicator, functioning as optically dense corpuscular labels. The key event in EIA was the affinity binding of marker erythrocytes on the walls of U- or V-shaped wells in the immunosorbent carrier, to specifically bound target ligands (antigens or antibodies). While the method offered a convenient one-step detection scheme, assay's simplicity, cost-effectiveness

and accessibility of the corpuscular label, these strengths were offset by low sensitivity, lack of responsiveness and the instability of erythrocyte markers. These shortcomings were largely overcome by the works of Plaksin, who developed a technology for producing stable erythrocyte-based diagnostics and designed an original ultramicro EIA method with superior analytical and procedural performance. This method was successfully applied in the diagnosis of a wide range of diseases.

Tools: replace or supplement?

The development of immune-analytical tests proceeded in two main directions. The first involved the integration of detection instrumentation into immunoassays. While this made diagnostic efficiency and outcomes dependent on advancements in optics, physics, mechanics, electronics, and related fields, it also allowed results to be quantitatively formalized. The latter greatly improved accuracy, reproducibility and sensitivity by reducing much of the subjectivity in result interpretation.

The second direction focused on enhancement methods based on the principles and best practices of hemagglutination and erythroimmunoabsorption. Specifically, it involved developing and optimizing instrument-free analytical systems with direct visualization of stereospecific interactions.

The pioneering work of Berson and Yalow was the beginning of the widespread use of radioisotopic labeling in immunoassays. They demonstrated the extraordinary sensitivity of detecting trace amounts of radioiodine-labeled insulin through its binding to specific antibodies. This achievement led to radioimmunoassay (RIA) being used to measure very low concentrations of serum insulin, which quantitatively competed with a radioactive hormone for corresponding antibody binding [27]. The principle of competitive inhibition with standardized radioactive antigens soon became a universal strategy for liquid-phase RIA, widely used to quantify hormones, pharmaceutical drugs, and other low-molecular-weight ligands.

RIA methods evolved along two main lines. On the one hand, there were improvements in labeling techniques and expansion of anti-ligand types that could be modified with radioactive isotopes. On the other, significant effort was directed towards the enhancement of the signal registration during detection processes, which gave rise to two distinct approaches: instrumentally arranged immunoradiometric assays (IRMA) and photodetection in radioautography [27–31]. In recognition of her work in developing RIA, Rosalyn Yalow was awarded the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 1977.

Another important milestone in immunoassay development was the introduction of the non-competitive radioallergosorbent test (RAST), first described in 1967 [32]. A simple and visually interpretable heterogeneous assay was used, later adopted by numerous researchers, where anti-IgE antibodies were immobilized on a solid phase. The immune complex that formed after the contact with test samples containing IgE was detected using iodine-131-labeled secondary antibodies.

At the same time, several factors limited the widespread diagnostic use of RIA: the need for special work conditions with radioactive isotopes; the reliance on expensive equipment and qualified personnel; the limited lifetime of radioactive labels; as well as associated health risks.

«Veni, vidi, vici»

The inherent drawbacks of RIA, combined with advances in enzymology, stimulated the development of novel immunochemical methods based on the use of various enzymes as labels. In the early 1970s, three research groups (in Sweden [33–36], Netherlands [37], and the United States [38]) independently proposed

the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in nearly identical forms. This development was foreshadowed by earlier studies demonstrating the possibility of conjugating enzymes with antibodies and antigens [39; 40].

Engvall and Perlmann described an assay that used an alkaline phosphatase-antibody conjugate. In this system, soluble IgG and the conjugate-bound IgG competed for binding to antibodies immobilized on a solid phase. Quantification of the ligand was achieved by measuring the enzymatic conversion of colorless p-nitrophenyl phosphate into yellow p-nitrophenol, detected by absorbance at 400 nm. Shortly thereafter, Van Weemen and Schuurs used horseradish peroxidase as the enzyme label in a conjugate system for quantifying urinary chorionic gonadotropin [37]. These two enzymes — alkaline phosphatase and horseradish peroxidase — became the primary tools for subsequent ELISA development.

The fact that specific reaction components interact on a solid-phase surface, and that their sequential replacement is possible, became the basis for designating such assays as solid-phase or heterogeneous. In contrast, homogeneous assays occur within the reaction mixture volume and involve similar steps but without dependence on a solid phase. Indeed, the advent of ELISA marked the beginning of an entire era of immune-analytical methods, the development of which continues today [41–46].

Since the early 1970s, ELISA methods have become widely used in medical diagnostics, biotechnology, and laboratory practice, largely replacing alternative techniques due to their distinctive advantages. Enzyme-linked immunosorbent assay is highly sensitive and allows simultaneous processing of multiple samples in fully or partially automated systems, without requiring extensive sample purification and preparation.

Nevertheless, ELISA has some drawbacks. It requires demanding storage conditions, and both substrates and enzymatic reaction products are unstable. These issues reduce the reliability of the enzyme-linked immunoassay test systems. ELISA efficacy is determined by the quality of the solid phase (its capacity to bind and stably preserve anti-ligands), the quality of immunospecific reagents, enzyme activity (as the main component of the reporter system), the properties of the substrate system, and the accuracy of the recording equipment.

Much of what has been stated about ELISA equally applies to immunofluorescence, another important immunoassay variant. In 1950, it was shown that fluorescent dyes could covalently bind antibodies without compromising their specific binding ability [47]. Subsequent development of fluorescence-based methods progressed along two parallel paths. Methodologically, immunofluorescence closely resembles enzyme-linked immunosorbent assay. The only difference is that the enzyme label requires a substrate for visualization, where the conversion product serves as a quantitative measure of the target ligand, whereas a fluorescent label 'shows' it directly through its own emission. In both assays, reliable result detection equipment is essential: an ELISA reader for enzyme-based assays and a fluorimeter for fluorescence-based assays. In each case, the results are formalized by a device that compares either the colorimetric difference between reference and test samples or their relative fluorescence intensities [48–51].

Chemiluminescent immunoassay combines features of both ELISA and immunofluorescence. Its defining feature is the detection of specific interactions through the registration of luminescent energy released by a chemical reaction [52]. This method has become widely used and is well established, primarily due to advanced detection equipment, which provides excellent analytical performance with particularly high sensitivity. The synthesis of affinity compound-luminophore conjugates is generally similar to that of fluorescent reagents [53–55].

There is no limit to perfection!

The development and improvement of immunoanalytical researches equipment, advances in the synthesis of fluorochrome conjugates and affinity compounds, and most importantly, researchers' desire to obtain quantitative data rather than solely visualizing cells and tissues in microscopy, led to the emergence of flow cytometry. First described in 1976 [56; 57], flow cytometry provided a means to detect the distribution of cellular antigens that were difficult or impossible to observe with conventional microscopy, while also offering faster and more accurate analysis.

Flow cytofluorimetry has developed more rapidly than any other quantitative immunoassay technique. It allows the evaluation of antigen expression at the level of cell population. Individual cells labeled with fluorescently tagged antibodies exhibit varying luminous intensity depending on their antigen expression. The flow cytometer automatically detects and records these fluorescence signals for each cell. This method can reliably detect even small populations of cells expressing target antigens at very low frequencies.

The high-speed analytical capacity of flow cytometry enables precise quantification of fluorescent labels in individual cells. By using two or more antibody preparations with different specificities, each labeled with a distinct fluorochrome, it is possible to assess the expression of molecules reacting with these antibodies across the entire investigated cell population. Experimental results, along with controls, can be stored and used for comparison in subsequent experiments [58–61].

In essence, a flow cytometer integrates the operational principles of both fluorescence microscopy and hematology analyzers. It combines three core components to implement the method: a light source with a flow system, an optical system, and an electronic data processing module [62–69].

The evolutionary development of immunological diagnostics detailed in this paper can be seen as a continuous path of technological improvement in detection systems. It originated from researchers' desire to quantitatively formalize immune complexes formation using instrumental techniques. This ongoing process of advancement, and the increasing complexity of instrument-based methods, began with the simplest photoelectric colorimeters, which measured changes in luminous flux intensity passing through turbid solutions. These devices led to the turbidimetric assay (from Latin *turbidus* — murky) [70–74].

Although the development of immunoassay techniques has been closely associated with advancements in instrumental result registration, they do not cover the full range of possible methodological approaches. This article focuses only on analytical methods that are widely used in global diagnostic and scientific research practice. Literature describes numerous alternative techniques developed in specific research laboratories [52; 75–85]. These methods illustrate the broader potential of analytical approaches rather than representing a strategic focus in diagnostic science.

The great Darwin proved that simplification is also a mechanism of evolutionary development

An analysis of the evolution of immunological research methods would be incomplete without considering an alternative trajectory of analytical development: namely, instrumental-independent techniques. Numerous agglutination tests using erythrocytes as indicator systems form the foundation of a distinct branch of analytical immunochemistry. These methods focus on the detection of stereospecific interactions through diagnostics with indicator element either generated through colorimetric reactions or inherently colored and visible to the human eye. This feature

makes the tests suitable for “in situ” and “at-home” testing, now more commonly referred to as “point-of-care” testing, which is currently a major development priority in immune-analytical assays.

All these methods share a key feature: they are either entirely or almost entirely instrumental-independent. They are applied across a range of disciplines, including biology, medicine, agriculture, and criminology; and are suitable not only for specialized medical facilities, but also for small clinical laboratories, doctors’ offices, for home and field use.

The evolution of these methods is influenced by two main factors. First, medical staff require rapid diagnostic assessment during patient encounters. Second, there is a growing public demand for personal health monitoring. Interest is especially high for lifestyle-related conditions such as obesity, drug addiction, alcoholism and atherosclerosis. The current economic climate also favors the development of self-diagnosis analytical systems. For example, the increasing trend among working women to delay childbearing has driven demand for ovulation prediction and early pregnancy detection tools [86–88].

Finally, rapid, instrument-free diagnostic systems are particularly valuable in clinical and emergency medical settings, where they can facilitate urgent blood transfusions during acute emergencies or large-scale epidemic events.

Immunoanalytical testing methods have recently gained considerable importance in veterinary medicine and food industry. They are applied not only in specialized animal clinics and diagnostic laboratories, but also in field conditions and on individual farms. Technological innovations originally developed for human disease diagnostics have proven equally effective in this context [89; 90]. Three main areas of immunodiagnostic application in veterinary medicine and the food industry are as follows:

- 1) fertility assessment, including measurement of progesterone and estrone sulfate levels in bovine milk [91–95]);
- 2) diagnostics and detection of infectious diseases, such as parvovirus infection, leukemia and enteritis pathogens [96–98]);
- 3) food safety monitoring, including detection of toxins and harmful substances in produce [99–102].

The development of simplified, instrument-free immunoassay methods essentially follows the improvement patterns of instrument-based immunoanalytical techniques. One direction focuses on modifying the solid-phase reagent (immunosorbent) to increase the amount of sorbed anti-ligand or to incorporate anti-ligand compound with superior binding characteristics. The other direction concerns improving the detection method, which can be achieved either by optimizing the characteristics of the affinity compound bound to the label, enhancing its reporter characteristics, or increasing the amount of label bound during detection.

Enzyme-linked immunosorbent systems are increasingly used in non-laboratory settings. Particular emphasis is placed on the substrate systems that generate insoluble colored products. Horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, and glucose oxidase are the primary enzymes used as labels in such systems.

This approach yields clear visualization of varying colors and staining intensities, as the enzymatic reaction product accumulates precisely at the sites of enzyme label localization. Yet this method has significant limitations: enzyme conjugates retain their analytical properties only for a short period, and the test kits require strict storage and transportation conditions. Other disadvantages include the instability of chromogenic substrates and their products, poor solubility of chromogens in water, insufficient color intensity of certain reaction products, and most critically, toxic, carcinogenic and mutagenic properties of most of the chromogenic compounds.

What if it's even simpler? One step and you're done!

A particularly attractive approach involves the use of non-enzymatic labels, which enables detection through simple visual readout without the need for multi-step addition of manifesting components. This method has two main advantages: first, it ensures the safety of the analysis procedure; second, it reduces labor and processing time. Fundamentally, the aim was to build upon and refine the original advances in hemagglutination and erythroimmunoabsorption systems. This involves enhancing the visualization capabilities of conjugate reporter groups and developing stable, reproducible methods for diagnostics synthesis.

Researchers have now turned their attention to optically contrastive microparticles of both natural and synthetic origin that have the potential to serve as labels in diagnostic reagents. Earlier work focused on attempts to use of anti-ligands conjugated with colloidal gold particles [103–111], likely building on prior experience of using these particles as electron-dense markers in microscopy [112–115]. This method allowed direct visual detection of stereospecific interactions without additional visualization steps. By synthesizing particles ranging in size from 5 nm to 1 μm , researchers produced conjugates suitable for nearly all known assay configurations, as will be discussed below.

Although technological methods used to obtain colloidal gold particles [116–120] will not be detailed here, it is important to note that almost all authors reported instability of the resulting sols. Particle stabilization was accomplished through the conjugate synthesis by mixing metastable colloidal sols with antibodies [121]. The antibody binding capacity was controlled by monitoring red color retention; with excess anti-ligand causing the colloid color to shift from red to blue. Further conjugate particle stabilization was achieved through polyethylene glycol supplementation [118], while more refined size-based fractionation was carried out via density gradient centrifugation with glycerol or sucrose [121].

Researchers successfully developed a stable, optically contrastive label and a detection reagent that maintained stability for several months [122]. However, technical challenges in producing stable reagents, combined with insufficient sensitivity due to the label's low chromophoricity, have limited their widespread use. The large-scale introduction of colloidal gold particle-based detection systems into the diagnostic market has not been realized. Presumably, these systems could not compete with more contrast-rich and stable diagnostic reagents, although they did find application where high sensitivity is not required [179].

Colored liposomes have been proposed as particle labels in approaches that enable simple visual result interpretation. One illustrative liposome preparation method involves first mixing a egg lecithin in a chloroform/methanol system with cholesterol in chloroform, followed by replacing the organic solvent with water. Such particles can carry detectable marker under defined conditions; for example, phosphatidylcholine-based liposomes are saturated with sulforhodamine B, and antibodies specific to human chorionic gonadotropin beta-subunit are covalently attached to their surface. Antibodies targeting the hormone's alpha-subunit are immobilized on a nitrocellulose filter. After sample interaction with the membrane carrier and subsequent incubation with liposome-conjugated antibodies, matrices with distinct spot patterns are formed. A similar approach was successfully implemented in digoxin immunoassay, achieving detection for substance concentrations of 1–2.5 ng/ml in serum [123–125]. In this system, liposomes bound to immune complexes were lysed, and ligand concentration was determined either from the quantity of enzymes released during liposome lysis (horseradish peroxidase or alkaline phosphatase), or from the quantity of dyes saturating the colloidal particles. Despite these successes, liposomal diagnostics

methods have not been widely used in analytical practice, likely either due to the instability of liposomes under changing conditions (pH, ionic strength) resulting in colloid degradation, or to the insufficient label contrast for reliable results.

Latex particles offer substantially greater potential and can be manufactured in a wide size range, similar to colloidal gold particles. Efforts in latex particle synthesis have focused on obtaining functionally active particles with surface groups that are capable of covalent binding to proteins. The glutaraldehyde method represents a straightforward approach to crosslinking affinity compounds to particle surfaces. It established covalent bonds between amino groups on latex particles and target peptides [123]. The use of latex diagnostics in various arrangement formats enables the development of a broad spectrum of analytical systems: agglutination tests (for e. g., streptolysin antibody detection, leptospirosis diagnosis [126–129]), group A streptococcus detection [130–132]; immunochromatographic (lateral flow) assays that provide results within 3–5 minutes (for e. g., pregnancy testing via urinary human chorionic gonadotropin detection) [133; 134]; group A streptococcus detection [135; 136]; influenza diagnostic [137; 138]; and fertility monitoring [139; 140]. Limitations include insufficient sensitivity due to chromophore properties, strict technological requirements for synthesis which increase the risk of non-specific interactions, insufficient stability of latex microspheres during storage (anti-ligand leakage), particularly under non-ideal conditions (e. g., temperature fluctuations), and the hook-effect, which is discussed further below.

Magnetic particles, whose early development was linked to latex technology, are noteworthy for immunoassays, although they require special equipment to realize their potential. Norwegian researchers were among the first to study magnetic particle applications [141; 142], using 4.5 μm magnetic particles to isolate T- and B-lymphocytes from blood. For this purpose, latex particles were loaded with magnetic compounds, and monoclonal antibodies were crosslinked to the polystyrene surface. Following incubation with whole blood, the particles were separated with cobalt-samarium magnets and subsequently analyzed for quantitative evaluation, essentially establishing a magnetic separation technique for sample preparation. Recent years have seen significant advances in applying magnetic iron-carbon particles to immunoassays based on nuclear magnetic resonance. In these constructions, the reporter moment is the change in the fixed proton relaxation time (T_2) in the system containing an affinity compound initially adsorbed on a solid phase, the target ligand, magnetic iron-carbon particles functionalized with ligand-specific molecules like antibodies. The proton relaxation time in such a system is inversely proportional to the quantity of magnetic particles bound by the immune complex, which in turn is proportional to the quantity of bound ligand [143; 144]. This method illustrates a hybrid immunodetection approach because it complements the spectrum of both instrumental and non-instrumental immunoassay systems, as both principles are present in the test procedure [145; 146].

Several attempts have been made to develop original detection systems based on any optically dense particles, including spherical particles of silicon dioxide [147–149], polyacrylamide microspheres with a diameter of 3–10 μm [150], iron (III) oxide particles [151], colored polymers [152; 153], and elemental particles (sulfur, selenium, tellurium, and phosphorus [154–158]). While all these attempts produced functional analytical systems, they were not adopted in global diagnostic practice. Based on our experience in the field, this can be attributed to limitations in sensitivity, specificity, and stability of reagents, which in turn affect overall reliability of such systems.

Of particular interest there are studies using dyes as labels. Unlike dyed latex particles, where the loading of chromophores is constrained by the physicochemical parameters of the heterogeneous organic phase / dye system, these approaches use the dye particles themselves as immobilisation matrices for affinity compounds [159–163]. This configuration achieves complete chromophore saturation. Immunoreagents

are produced from water-soluble dyes, which can be converted into fine suspensoid particles in the aqueous phase. Under optimized conditions, the particle surface sorbs well due to hydrophobic interactions and electrostatic forces of various immunoreactive compounds, forming convenient reagents for immunodiagnostics. However, commercial application is greatly limited by instability, particularly under variable storage conditions, including temperature, pH, and ionic strength of the solution.

The issues discussed above underscore major trends in the evolution of detection methods used in immunoassay systems. It is evident that, to satisfy the demands of the developing test systems, detection components themselves must combine at least two elements optimally: a signal-generating element with reporter properties that require no additional steps or efforts for visualization or amplification, and an anti-ligand with sufficient affinity and specificity. A critical factor in test kits development is the stability of these components, particularly the bonding strength between the label and the immunoreactive compound, which is typically achieved through covalent bonding. Equally important is the stability of the label itself, which is determined by its origin. Beyond these component requirements, the development of new high-efficiency detection also hinges on the establishment of robust production technologies, ensuring the generation of durable and stable reagents. Consequently, the main challenges in immunoanalytical systems development include both the careful selection and optimization of component preparation methods, on the one hand, and the design of novel high-yield synthesis technologies for detection reagents, on the other.

As noted above, erythrocytes, dyed latex particles, colloidal gold, and other materials have been used as labels in detection reagents development. This article will primarily focus on analyzing the current state of suspended dye particles as labeling agents, which will be discussed in the sections below.

For several years, Adamov pursued the development of suspension antigens and antibodies as immunodiagnostic reagents [164]. By the late 1960s, Adamov's research stopped for unclear reasons. His approach involved using suspension antigens and antibodies as diagnostic reagents. The antigens and antibodies were immobilized onto particle surfaces via adsorption. To achieve this, various stable in saline solution compounds—including rosolic acid, phenol red, phenolphthalein, alizarin, lead hydroxide hydrate, carmine, methyl orange, thionine, bismuth citrate, α -aminoanthraquinone, dermatol, infusorial earth, polyvinyl chloride F, thymol blue, anthragallol, animal charcoal, and tribasic calcium phosphate—were mixed with solutions of either antigens or immune serum. The resulting reagents were used to detect relevant antibodies and antigens through agglomeration reactions, essentially functioning as agglutination tests. The cessation of this research may have been caused by the following factors: 1) difficulty in producing stable suspension in solutions; 2) instability of the reagents during storage; 3) a high degree of nonspecific interactions.

Nearly 15 years later, an article [165] presented a practical approach to the same concept of developing immunodiagnostic reagents for direct visualization with the usage of hydrophobic dyes as labels. The dyes included four Palanil colors, two Terasil colors, Cubacet, Foron, Resolin, Procinyl, and four Samaron colors. The researchers obtained conjugates of suspension particles of dyes with sheep, rabbit and mouse monoclonal immunoglobulins against hCG. The same method of direct sorption of immunospecific compounds on the particles surface was used. The reagents enabled the hCG determination in the agglutination reaction, but the stability of these reagents did not exceed 2.5 months. Later, the same author reported improvements in assay sensitivity using the previously described reagents, achieving detection limits of

2–13 IU/L for hCG and 10–1000 ng/mL for alpha-fetoprotein in a sandwich assay format. Despite these enhancements, the problem of reagent storage stability persisted [159].

These challenges likely account for the absence of commercial diagnostic kits with instrument-free test systems with direct ligand visualization via colorimetric dyes in the global biotechnological market. Nevertheless, the attractive prospect of highly sensitive direct visualization continues to drive research efforts toward new diagnostic reagents.

In their search for high-contrast labels, researchers explored the use of tetrazolium salts and their reduced forms—formazans—for staining latex microspheres [166–168]. The intense blue and violet colors of reagents based on tetrazolium salts and formazans offer distinct advantages over derivatives of metallic and non-metallic compounds. However, these conjugates still face the same stability and sensitivity limitations. Nevertheless, in the current instrument-free tests diagnostic market, latex-based systems (primarily those configured for immunochromatography) remain the dominant technology.

Researchers eventually turned their attention to colloidal carbon particles, whose intense black color suggested superior potential for reagent development. Early investigations were advanced by two pivotal studies that systematically evaluated the possible use of colloid carbon particles in immunodiagnostics [169; 170]. Both articles reported detailed methodologies for preparing conjugates based on carbon black particles (namely, products from Cabot Corporation, Vulcan & Monarch, USA), and outlined application methods of the obtained reagents in immunoanalytical systems of different formats. Importantly, the method for producing these diagnostic reagents still relied on non-covalent conjugation of immunoreactive compounds to the carbon particles.

The main practical challenges lie not only in enhancing detection system sensitivity through optimal reagent selection, but also in ensuring reagent stability in commercial test kits. This requires developing conjugation methods that facilitate strong covalent bonds between affinity compounds and detection labels. Successful resolution of these challenges would enable the introduction of fundamentally new instrument-free analytical systems to the diagnostic market.

Research initiated in the early 1990s deserves particular attention. For the first time, a technology was developed and validated that addressed both critical requirements for advancing instrument-free diagnostics: strong covalent binding of affinity compounds and the use of the most optically contrasting label (a nanosized colloidal carbon particle) [180]. This achievement led to the creation of a functional diagnostic system and a wide array of test-system models. In terms of both analytical and procedural characteristics, they successfully competed with instrument-based enzymatic test systems [171–175]. By employing a highly visible non-instrumental contrast label and a covalent binding mechanism for the affinity compound, the researchers ensured reliable diagnostics. The size and properties of the carbon label facilitated the development of functional instrument-free assay systems across all express-test formats, including dot-blot assays on both non-porous and porous solid phases (including multiplex versions, [171; 173]), immunochromatography (IC), and immunofiltration (IF) [175; 179].

Recent research has introduced a new approach to enhancing the sensitivity of simplified testing systems with nanozymes—nanoparticles of various compositions that exhibit horseradish peroxidase-like activity. A representative example is protein nanoparticles impregnated with hemin molecules. These diagnostic reagents demonstrate horseradish peroxidase-like activity in the presence of hydrogen peroxide, catalyzing the conversion of the substrate (TMB) with a visible color change [176].

Prussian blue nanoparticles also exhibit horseradish peroxidase-like activity that exceeds the activity of the natural enzyme [177; 178]. The synthesis of Prussian blue nanoparticles involves the controlled mixing of two iron salts. These promising peroxidase alternatives have the potential to replace horseradish peroxidase (HRP), thereby alleviating significant challenges and costs associated with isolating HRP from natural sources. This approach offers several advantages: eliminating labor-intensive purification processes required to achieve reagent purity, and using substantially cheaper and more readily available starting materials for nanoparticle synthesis.

As for the arrangement formats of non-instrumental test systems, the field demonstrates low diversity. There is little transition from agglutination tests in wells of immunoassay plates or Terasaki plates to dot-analysis, immunochromatography, and immunofiltration. Currently, IC systems dominate the market, which presents a curious paradox. The IC method has one major drawback, namely, the hook effect. In certain conditions, it can significantly distort measurement results, particularly at high concentrations of the target ligand. IF systems are free from this problem. However, the number of IF systems on the diagnostic market is notably lower. This discrepancy may be explained by both the technological complexities of IF diagnostic systems production and by manufacturer conservatism.

Conclusions

There is no doubt about the constant demand for relevant tools in diagnostic practice. At the same time, it is clear that significant improvements in testing metrics remain essential—particularly in sensitivity, specificity, accuracy, reliability, reproducibility, accessibility, speed, procedural simplicity, and affordability. It is evident that uniting all these features, along with their required enhancement, into a single analytical system is impossible. Therefore, every type of diagnostic testing used in real clinical practice requires continuous improvement. Fundamental science, in turn, is capable of designing the tools and materials that practical medicine demands.

Without high-quality diagnostic tools we will not be able to achieve early, accurate, and accessible detection of disease symptoms (especially before clinical manifestations appear) together with near real-time patient monitoring and rapid assessment of the body's response to therapeutic interventions. At present, this remains an unfulfilled aspiration for both doctors and patients. However, the analysis of the evolutionary pathways of testing methods detailed in this article suggests that this goal may become attainable in the near future.

Funding: R&D theme 124020500027-7 (Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences).

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование: Тема НИР 124020500027-7 (Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Harma H. Particle technologies in diagnostics. National Technology Agency. Technology Review. Helsinki. 2002, 126, 1—30.
2. Widal F. On the sero-diagnosis of Thiphoid fever. The Lancet. 1896, 148(3820), 1371—1372, DOI: 10.1016/s0140-6736(01)76589-0.

3. Wassermann A., Neisser A., Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Deutsche medizinische Wochenschrift*: Berlin. 1906, 32, 745—746.
4. Landsteiner K., Thomas C. C. The Specificity of Serological Reactions. 1936.
5. Heidelberger M. Quantitative absolute methods in the study of antigen-antibody reactions. *Bacteriol. Rev.* 1939, 3(1), 49—95, DOI: 10.1128/br.3.1.49-95.1939.
6. Kraus R. Ueber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-Typhus-Pestbouillonculturen erzeugt durch homologes Serum. [On specific reactions in germ-free filtrates from cholera- typhoid- plague- broth cultures produced by homologous serum]. Published in *Wiener klinische Wochenschrift*. 1897, 10, 32, 760—763, DOI: 10.3390/toxins16010033.
7. Ehrlich P. The Croonian lecture: On immunity. *Proc. R. Soc. Lond.* 1900, 66, 424.
8. Marrack J. R. The Chemistry of Antigens and Antibodies. Medical Research Council, Special Report Series. 1938, 230, 194.
9. Oudin J. L'analyse immunochimique du sérum de cheval par précipitation spécifique en milieu gélifié; premiers résultats [Immunochemical analysis of horse serum by specific precipitation in gelified medium; first results]. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. 1947, 29(1—3), 140—149.
10. Elek S. D. Rapid identification of *Proteus*. *J. Pathol. Bacteriol.* 1948, 60(2), 183—192, DOI: 10.1002/path.1700600204.
11. Ouchterlony O. Air-borne infections; infection and spreading of infection in diphtheria with special reference to isolation wards. *Acta Med. Scand.* 1949, 134(4), 296—309.
12. Grabar P., Williams C. A. Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1953, 10(1), 93—94, DOI: 10.1016/0006-3002(53)90233-9.
13. Mancini G., Carbonara A. O., Heremans J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 1965, 2(3), 235—254, DOI: 10.1016/0019-2791(65)90004-2.
14. Laurell C. B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.* 1966, 15(1), 45—52, DOI: 10.1016/0003-2697(66)90246-6.
15. Coombs R. R. A., Mourant A. E., Race R. R. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br. J. Exp. Pathol.* 1945, 26(4), 255—266.
16. Gupta S. K., Talwar G. P. Monoclonal antibodies based sandwich erythro-immunoassay and 'dot' enzyme immunoassay for human chorionic gonadotropin in urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1986, 46(8), 751—759, DOI: 10.3109/00365518609084047.
17. Gupta S. K., Guesdon J. L., Avrameas S., Talwar G. P. Sandwich enzyme immunoassay of human chorionic gonadotropin using polystyrene beads as solid support. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 1985, 136D(1), 47—55, DOI: 10.1016/s0769-2625(85)80074-x.
18. Bravo Oliva J. Rapid agglutination test on microscope slides in routine serological diagnosis. *Med. Cir. Guerra.* 1959, 21(3—4), 159—170.
19. Crosignani P. G., Polvani F., Surace M. Immunological assay of human chorionic gonadotrophin using HCG-coupled red cells agglutination. *Folia Endocrinol.* 1963, 16, 650—663.
20. Maurice Y., Provost A. Hemagglutination and hemagglutination inhibition tests with horse sickness virus. Limits of their interpretation. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 1966, 19(4), 439—450.

21. Adler F. L., Liu C. T. Detection of morphine by gemagglutination-inhibition. *J. Immunol.* 1971, 106, 1684–1685.
22. Dierks R. E., Gough P. M. Passive haemagglutination test for rabies antibodies. *Monogr. Ser. World Health Organ.* 1973, 23, 147–150.
23. Van Doorn H. R., Hofwegen H., Koelewijn R., Gilis H., Wentink-Bonnema E., Pinelli E., et al. Reliable serodiagnosis of imported cystic echinococcosis with a commercial indirect hemagglutination assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 57(4), 409–412, DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.002.
24. Coombs R. R. A. Assay utilizing red cells as markers. In: *Immunoassay for 80's*. Ed. A. Voller. MTP Press, Lancaster. 1981, 17–34.
25. Coombs R. R. A., Munro A. J. Storage-stable antibody-linked eritrocytes. *Pat.* 2138132. 1984.
26. Guesdon J. L., Avrameas S. Sensitive titration of antibodies and antigen using eritro-immunoassay. *Ann. Immunol.* 1980, 131, 3, 389–396.
27. Berson S. A., Yalow R. S. Insulin antagonists, insulin antibodies and insulin resistance. *J. Med.* 1958, 25(2), 155–159, DOI: 10.1016/0002-9343(58)90022-6.
28. Ekins R. P. Radioimmunoassay and saturation analysis. Basic principles and theory. *Br. Med. Bull.* 1974, 30(1), 3–11, DOI: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a071163.
29. Teale J. D. Radioimmunoassay. 2 Scientific Foundations of Clinical Biochemistry. Chapter 19. Heinemann Medical. 1978, 279.
30. Erlanger B. F., Borek F., Beiser S. M., Lieberman S. Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.* 1957, 228(2), 713–727.
31. Byrnes D. J., Henderson L., Borody T., Rehfeld J. F. Radioimmunoassay of cholecystokin in human plasma. *Clin. Chim. Acta.* 1981, 19, 111(1), 81–89, DOI: 10.1016/0009-8981(81)90424-1.
32. Wide L., Bennich H., Johansson S. G. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet.* 1967, 2, 1105–1107, DOI: 10.1016/s0140-6736(67)90615-0.
33. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971, 8, 9, 871–874, DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.
34. Engvall E., Jansson K., Perlmann P. ELISA. Quantitative assay of protein antigen, IgG by means of enzyme — labelled antigen and antibody coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta.* 1971, 251, 427–434, DOI: 10.1016/0005-2795(71)90132-2.
35. Engvall E., Perlmann P. Enzyme — linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobuline in antigen coated tubes. *J. Immunol.* 1972, 109, 129–135.
36. Engvall E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins. Ed.: T. M. S. Chang. Plenum Press: N. Y. 1977, 2, 87–96.
37. Van Weemen B. K., Schuurs A. H.W.M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. *FEBS Lett.* 1971, 15, 232–236, DOI: 10.1016/0014-5793(71)80319-8.
38. Rubinstein K. E., Schneider R. S., Ullman E. F. “Homogeneous” enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972, 47, 846–851, DOI: 10.1016/0006-291X(72)90570-0.

39. Avrameas S., Uriel J. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. C. R. Acad. Hebd. Seances Acad. Sci. D. 1966, 262(24), 2543—2545.
40. Nakane P. K., Pierce G. B. Enzyme-Labelled antibodies preparation and application for the localization of antigen. J. Histochem. Cytochem. 1966, 14, 929, DOI: 10.1083/jcb.33.2.307.
41. Lam S. K., Devine P. L. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. Clin. Diagn. Virol. 1998, 10(1), 75—81, DOI: 10.1016/s0928-0197(98)00002-6.
42. Dutaud D., Aubry L., Henry L., Levieux D., Hendil K. B., Kuehn L., et al. Ouali Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. J. Immunol. Methods. 2002, 260(1—2), 183—193, DOI: 10.1016/s0022-1759(01)00555-5.
43. Pare J., Simard C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. Can. J. Vet. Res. 2004, 68(4), 254—258.
44. Desai N., Filipovits J., Goldfarb J. Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and implantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit. Reprod. Biomed. Online. 2006, 13(2), 272—277, DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60626-8.
45. Ebinuma H., Miida T., Yamauchi T., Hada Y., Hara K., Kubota N., et al. Improved ELISA for Selective Measurement of Adiponectin Multimers and Identification of Adiponectin in Human Cerebrospinal Fluid. Clin. Chem. 2007, 53(8), 1541—1544, DOI: 10.1373/clinchem.2007.085654.
46. Tsao Z. J., Liao Y. C., Liu B. H., Su C. C., Yu F. Y. Development of a Monoclonal Antibody against Domoic Acid and Its Application in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunostrip. J. Agric. Food Chem. 2007, 55(13), 4921—4927, DOI: 10.1021/jf0708140.
47. Coons A. H., Kaplan M. H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 1950, 91(1), 1—13, DOI: 10.1084/jem.91.1.1.
48. Frank D. S., Sundberg M. W. Fluorescent labels comprising rare earth chelates. US Patent 4283382A. 1978.
49. Lovgren T., Heinonen P., Lehtinen P., Hakala H., Heinola J., Harju R., et al. Sensitive bioaffinity assays with individual microparticles and time-resolved fluorometry. Clin. Chem. 1997, 10, 1937—1943.
50. Chan W. C. W., Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science. 1998, 281, 2016—2018, DOI: 10.1126/science.281.5385.2016.
51. Arai R., Ueda H., Tsumoto K., Mahoney W. C., Kumagai L., Nagamune T. Fluorolabeling of antibody variable domains with green fluorescent protein variants: application to an energy transfer-based homogeneous immunoassay. Protein Eng. 2000, 13, 369—376, DOI: 10.1093/protein/13.5.369.
52. Thorpe G. H., Williams L. A., Kricka L. J., Whitehead T. P., Evans H., Stanworth D. R. A rapid luminescently monitored enzyme immunoassay for Ig E. J. Immunol. Methods. 1985, 79(1), 57—63, DOI: 10.1016/0022-1759(85)90391-6.
53. Khadzhilov A. I. Analysis of luminescence of tissue and fluids in the human and animal organism. Izv. Meditsinskite Inst. Bulg. Akad. Naukite Sofia Otd. Biol. Meditsinski Nauki. 1951, 1, 33—64.

54. Akimoto K., Shinmen Y., Sumida M., Asami S., Amachi T., Yoshizumi H., et al. Luminol chemiluminescence reaction catalyzed by a microbial peroxidase. *Anal. Biochem.* 1990, 189(2), 182–185, DOI: 10.1016/0003-2697(90)90104-h.
55. Terashima T., Okochi N., Kanno M., Satomi S., Taguchi Y., Mori S., et al. Measurement of the chemiluminescence from rat hepatocytes on reperfusion injury: preliminary report. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1992, 93(8), 869.
56. Fulwyler M. J. Optical chamber with spherical reflective portion and apparatus employing same. UK patent 1561042. 1976.
57. Herzenberg L. A., Sweet R. G. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 1976, 234(3), 108–117.
58. Cook L., Irving D. Microsphere-based flow cytometric assays. *J. Clin. Immunoassay.* 1989, 12, 36–39.
59. Frengen J., Schmid R., Kierulf B., Nustad K., Paus E., Berge A., et al. Homogenous immunofluorometric assays of α -fetoprotein with macroporous, monosized particles and flow cytometry. *Clin. Chem.* 1993, 39, 2174–2181.
60. McHugh T. M. Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. *Methods Cell Biol.* 1994, 42, 575–595, DOI: 10.1016/s0091-679x(08)61096-1.
61. Soukka T., Paukkunen J., Härmä H., Lönnberg S., Lindroos H., Lövgren T. Supersensitive time-resolved immunofluorometric assay of free prostate-specific antigen with nanoparticle label technology. *Clin. Chem.* 2001, 47, 1269–1278.
62. Kruth H. S. Flow cytometry: rapid biochemical analysis of single cells. *Anal. Biochem.* 1982, 125(2), 225–242, DOI: 10.1016/0003-2697(82)90001-x.
63. Wan Dilla M. A., Dean P. H., Waerum O. D., Melamed M. R. *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis.* Academic Press: New York. 1985.
64. Jensen B. D., Horan P. K. Flow cytometry: rapid isolation and analysis of single cells. *Meth. Enzymol.* 1989, 171, 549–581, DOI: 10.1016/S0076-6879(89)71030-2.
65. Nolan J. P., Sklar L. A. The emergence of flow cytometry for sensitive, real-time measurements of molecular interactions. *Nat. Biotechnol.* 1998, 16(7), 633–638, DOI: 10.1038/nbt0798-633.
66. Edwards B. S., Oprea T., Prossnitz E. R., Sklar L. A. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, 8(4), 392–398, DOI: 10.1016/j.cbpa.2004.06.007.
67. Simons P. C., Shi M., Foutz T., Cimino D. F., Lewis J., Buranda T., et al. Ligand-receptor-G-protein molecular assemblies on beads for mechanistic studies and screening by flow cytometry. *Mol. Pharmacol.* 2003, 64(5), 1227–1238, DOI: 10.1124/mol.64.5.1227.
68. Waller A., Simons P., Prossnitz E. R., Edwards B. S., Sklar L. A. High throughput screening of G-protein coupled receptors via flow cytometry. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2003, 6(4), 389–397, DOI: 10.2174/138620703106298482.
69. Sklar L. A., Edwards B. S., Graves S. W., Nolan J. P., Prossnitz E. R. Flow cytometric analysis of ligand-receptor interactions and molecular assemblies. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2002, 31, 97–119, DOI: 10.1146/annurev.biophys.31.082901.134406.
70. Engler R., Judon C., Langlade J. P., Jayle M. F. An immunonephelometric determination of rabbit haptoglobin. Article in French. *C. R. Acad. Hebd. Seances Acad. Sci. D. Sci Nat.* 1975, 280(18), 2157–2159.

71. Van Munster P. J., Hoelen G. E., Samwel-Mantingh M., Holtman-Van Meurs M. A turbidimetric immuno assay (TIA) with automated individual blank compensation. *Clin. Chim. Acta.* 1977, 76(3), 377–388, DOI: 10.1016/0009-8981(77)90165-6.
72. Evans S. E. Rapid determination of alpha-fetoprotein in amniotic fluid using an automated immunoturbidimetric technique. *Ann. Clin. Biochem.* 1980, 17(3), 130–133, DOI: 10.1177/000456328001700305.
73. Kleine T. O., Merten B. Rapid manual immunoturbidimetric and immunonephelometric assays of prealbumin, albumin, IgG, IgA and IgM in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1980, 18(4), 245–254, DOI: 10.1515/cclm.1980.18.4.245.
74. Spencer K., Price C. P., Anthony F., Wood P. J. Kinetic immunoturbidimetry: the measurement of pregnancy specific beta 1glycoprotein. *Clin. Chim. Acta.* 1979, 99(2), 177–187, DOI: 10.1016/0009-8981(79)90041-x.
75. Boguslavski R. C., Li T. M. Homogeneous immunoassay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1982, 7(5), 401–414.
76. Oellerich M. Enzyme-immunoassay: a review. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1984, 22(12), 895–904.
77. Van Weemen B. K. ELISA: highlights of the present state of the art. *J. Virol. Methods.* 1985, 10(4), 371–378, DOI: 10.1016/0166-0934(85)90055-2.
78. Ekins R. P. Merits and disadvantages of different labels and methods of immunoassay. In: *Immunoassay for the 80's*. MTP Press: Lancaster. 1981, 5–16.
79. Ekins R. P., Dacubu S. The development of high sensitivity pulsed light, time-resolved fluoroimmunoassay. *Pure Appl. Chem.* 1985, 57, 3, 473–482.
80. Shall R. F., Tenoso H. J. Alternatives to radioimmunoassay: labels and methods. *Clin. Chem.* 1981, 27, 7, 1157–1164.
81. Olsson T., Thore A. Chemiluminescence and its use in immunoassay. In: *Immunoassay for the 80's*. MTP Press: Lancaster. 1981, 113–125.
82. Woodhead J. S., Weeks I. Chemiluminescence immunoassay. *Pure and Appl. Chem.* 1985, 57, 3, 523–529.
83. Fukada H., Haga A., Fujita T., Hiramatsu N., Sullivan C. V., Hara A. Development and validation of chemiluminescent immunoassay for vitellogenin in five salmonid species. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2001, 130(1), 163–170, DOI: 10.1016/S1095-6433(01)00381-6.
84. Lin J., Ju H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. *Biosens Bioelectron.* 2005, 20(8), 1461–1470, DOI: 10.1016/j.bios.2004.05.008.
85. Liu Y. M., Mu H. B., Zheng Y. L., Wang C. Q., Chen Y. H., Li F. R., et al. Capillary electrophoretic immunoassay for alpha-fetoprotein with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 855, 2, 280–285, DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.04.033.
86. Lindstedt G., Himmelmann C. E., Salsmans R., Valentin K. Home testing for pregnancy—can it be recommended? *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1982, 42(4), 371–376.
87. Wang C. F., Gemzell C. Neocept: a simple, sensitive urine test of early pregnancy in women undergoing ovulation induction. *J. Reprod. Med.* 1982, 27(4), 193–195.
88. Nielsen M. S., Barton S. D., Hatasaka H. H., Stanford J. B. Comparison of several one-step home urinary luteinizing hormone detection test kits to OvumQuick. *Fertil. Steril.* 2001, 76(2), 384–387, DOI: 10.1016/S0015-0282(01)01881-7.

89. Anderton D. J., Gronow M., Kungdon C. F. M., Ghesman J. Tools for decentralized clinical biochemistry testing. Optimal use of the clinical laboratory. Karger: Basel. 1986, 129–136.
90. Jeffers J. G., Shanley K. J., Meyer E. K. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991, 198(2), 245–250.
91. Laing J. A., Heap R. B. The concentration of progesterone in milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.* 1971, 127(8), 19–22, DOI: 10.1016/s0007-1935(17)37432-8.
92. Sauer M. J., Foulkes J. A., Cookson A. D. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids*, 1981, 38, 45–53, DOI: 10.1016/0039-128X(81)90020-9.
93. Davies J., Fletcher N. A. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for the quantitative assessment of progesterone in buvine milk samples. *Vet. Record.* 1987, 1209110, 257–258, DOI: 10.1136/vr.120.11.257.
94. Saba N. J., Hattersley J. P. Direct estimation of estrone sulphate in cow serum for a rapid pregnancy diagnosis test. *J. Reprod. Fertil.* 1981, 62, 87–92, DOI: 10.1530/jrf.0.0620087.
95. Hamon M., Fleet I. R., Holdsworth R. J., Heap R. B. The time of detection of estrone sulphate in milk and the diagnosis of pregnancy in cows. *Br. Vet J.* 1981, 137(1), 71–77, DOI: 10.1016/s0007-1935(17)31790-6.
96. Shen J. T. Gamma stick. US Patent 4135884A. 1979.
97. Al-Yousif Y., Anderson J., Chard-Bergstrom C., Bustamante A., Muenzenberger M., Austin K, et al. Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001, 8(3), 496–498, DOI: 10.1128/CDLI.8.3.496-498.2001.
98. Al-Yousif Y., Anderson J., Chard-Bergstrom C., Kapil S. Development, evaluation, and application of lateral-flow immunoassay (immunochromatography) for detection of rotavirus in bovine fecal samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002, 9(3), 723–724, DOI: 10.1128/CDLI.9.3.723-724.2002.
99. Heathcote J. G., Hillert J. R. Aflotoxins: Chemical and biological aspects. *Development's in Food science.* Elsevier: Amsterdam. 1978, 1, 97–108.
100. Watanabe H., Satake A., Kido Y., Tsuji A. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst.* 2002, 127(1), 98–103, DOI: 10.1039/B109427K.
101. Zhou P., Lu Y., Zhu J., Hong J., Li B., Zhou J., et al. Nanocolloidal gold-based immunoassay for the detection of the N-methylcarbamate pesticide carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52(14), 4355–4359, DOI: 10.1021/jf0499121.
102. Zhang H., Meyerhoff M. Gold-coated Magnetic particles for solid-phase immunoassay: enhancing immobilized antibody binding efficiency and analytical performance. *Anal. Chem.* 2006, 78, 609–616, DOI: 10.1021/ac051720x.
103. Egger D., Bienz R. Colloidal gold staining and immunoprobings of proteins on the same nitrocellulose blot. *Anal. Biochem.* 1987, 166, 413–417, DOI: 10.1016/0003-2697(87)90592-6.
104. Kramarcy N. R., Sealock R. Commercial preparations of colloidal gold-antibody complex frequently contain free active antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 1991, 39(1), 37–39, DOI: 10.1177/39.1.1983872.
105. Chakraborty U. R., Black N., Brooks H. G., Campbell C., Gluck K., Harmon F., et al. An immunogold assay system for the detection of antigen or antibody. *Ann. Biol. Clin.* 1990, 8, 403–408.

106. Martin J. M., Paques M., van der Velden-de Groot T. A., Beuvery E. C. Characterization of antibody labelled colloidal gold particles and their applicability in a sol particle immunoassay (SPIA). *J. Immunoassay*. 1990, 11(1), 31–47, DOI: 10.1080/01971529008053256.
107. Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A., Langanger G., De Mey J. Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assay with immunogold and immunogold silver staining. *J. Immunol. Meth.* 1984, 74920, 353–360, DOI: 10.1016/0022-1759(84)90303-X.
108. Leuvering J. H., Thal P. J., van der Waart M., Schuurs A. H. Sol particle immunoassay (SPIA). *J. Immunoassay*. 1980, 1(1), 77–91, DOI: 10.1080/01971528008055777.
109. Leuvering J. H., Goverde B. C., Thal P. J., Schnurs A. H. A gomogeneous sol particle immunoassay for human chorionic gonadotrophin using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* 1983, 60, 9–23, DOI: 10.1016/0022-1759(83)90330-7.
110. Zhang C., Zhang Y., S. Wang S. Development of multianalyte flow-through and lateral-flow assays using gold particles and horseradish peroxidase as tracers for the rapid determination of carbaryl and endosulfan in agricultural products. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54(7), 2502–2507, DOI: 10.1021/jf0531407.
111. Lee E. J., Kim Y., Lim J., Kim M., Kang C. S., Lee J. H., et al. Simple immunohistochemical staining method using large sized gold colloid conjugated secondary antibody. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2007, 37(2), 152–157.
112. Gamliel H., Polliack A. Scanning immunoelectron microscopy markers. *Isr. J. Medl Sci.* 1979, 15(8), 639–646.
113. Mannweiler K., Hohenberg H., Bohn W., Rutter G. Protein-A gold particles as markers in replica immunocytochemistry: high resolution electron microscope investigations of plasma membrane surfaces. *J. Microsc.* 1982, 126(Pt 2), 145–149, DOI: 10.1111/j.1365-2818.1982.tb00363.x.
114. DeWaele M., DeMey J., Moeremans M., Broodtaerts L., Smet L., VanCamp B. Colloidal gold as a marker for the light microscope detection of leukocyte cell surface antigens with monoclonal antibodies. *J. Clin. Immunol.* 1982, 2(3 Suppl), 24S–31S.
115. Hutchison N. J., Langer-Safer P. R., Ward D. C., Hamkalo B. A. In situ hybridization at the electron microscope level: hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J. Cell Biol.* 1982, 95(2 Pt 1), 609–618, DOI: 10.1083/jcb.95.2.609.
116. Romano E. L., Stolinsky C., Hughes-Jones C. An antiglobulin reagent labeled with colloidal gold for use in electron micriscipy. *Immunochem.* 1974, 11, 521–522, DOI: 10.1016/0019-2791(74)90162-1.
117. Roth J. The preparation of protein A-gold complexes with 3 nm and 15nm gold particles and their use in labelling multiple antigens on ultra-thin sections. *Histochem J.* 1982, 14(5), 791–801, DOI: 10.1007/BF01033628.
118. Horrisberger M., Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. Citochem.* 1977, 25, 295–305, DOI: 10.1177/25.4.323352.
119. Horrisberger M., Vonlanthen M. Simultaneous localization of hepatic binding protein specific for galactose and of galactose-containing receptors on rat hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 1978, 26, 960–966, DOI: 10.1177/26.11.722052.
120. Frens J. A device for quantative measuring of shivering in goats. *Lab. Anim.* 1973, 7(3), 287–288, DOI: 10.1258/002367773780944003.
121. Slot J. W., Geuze H. J. Sizing of protein A-colloidal gold probes for imunolectron microscopy. *J. Cell Biology.* 1981, 90(2), 533–536, DOI: 10.1083/jcb.90.2.533.

122. Van den Pol A. N. Colloidal gold and biotin-avidin conjugates as ultrastructural markers for neural antigens. *Quarterly J. of Experimental Physiology*. 1984, 69, 1–33, DOI: 10.1113/expphysiol.1984.sp002771.
123. Litchfield W. J., Freytag J. W., Adamich M. Highly sensitive immunoassays based on use of liposomes without complement. *Clin. Chem*. 1984, 30(9), 1441–1445.
124. Rongen H. A., Bult A., van Bennekom W. P. Liposomes and immunoassays. *J. Immunol. Methods*. 1997, 204(2), 105–133, DOI: 10.1016/s0022-1759(97)00041-0.
125. Compbeli R. L., Wagner D. B., O'Connell J. P. Solid phase assay with visual readout. US Patent 4703017A. 1987.
126. Remington J. S., Eimstad W. M., Aranjo F. G. Detection of immunoglobulin M antibodies with antigen-tagged latex particles in an immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol*. 1983, 17(5), 939–941, DOI: 10.1128/jcm.17.5.939-941.1983.
127. Sakai Y., Hibino M. Distribution-Analyzing latex immunoassay (DALIA): methods for determination of antigen and for elimination of non-specific reaction induced by rheumatoid factor. *Chem. Pharm. Bull*. 1989, 37, 11, 3010–3014, DOI: 10.1248/cpb.37.3010.
128. Liu Y. C., Dong G. J., Zhao Y. C. Preparation of diazotized polystyrene latex and its use in agglutination assays. *J. Immunol. Meth*. 1989, 124, 159–163, DOI: 10.1016/0022-1759(89)90348-7.
129. Gerber M. A., Caparas L. S., Randolph M. F. Evaluation of a new latex agglutination test for detection of streptolysin O antibodies. *J. Clin. Microbiol*. 1990, 28(3), 413–415, DOI: 10.1128/jcm.28.3.413-415.1990.
130. Reichwein B., Jungkind D., Guardiani M., Gilbert R., Prosswimmer G., Amadio P. Comparison of two rapid latex agglutination methods for detection of group A streptococcal pharyngitis. *Am. J. Clin. Pathol*. 1986, 86(4), 529–532, DOI: 10.1093/ajcp/86.4.529.
131. Fujikawa S., Ohkuni M. A new latex agglutination test for rapid diagnosis of group A streptococci. *Jpn. Circ. J*. 1986, 50(12), 1251–1252, DOI: 10.1253/jcj.50.1251.
132. Chang M. J., Mohla C. Ten-minute detection of group A streptococci in pediatric throat swabs. *J. Clin. Microbiol*. 1985, 21(2), 258–259, DOI: 10.1128/jcm.21.2.258-259.1985.
133. Hanlon J. T., Caiola S. M., Muhlbaier L. H., Dennis B. H., Edelman D. A., Dingfelder J. R. An evaluation of the sensitivity of five home pregnancy tests to known concentrations of human chorionic gonadotropin. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1982, 144(7), 778–782, DOI: 10.1016/0002-9378(82)90351-9.
134. Imai S., Kouda Y., Nishihara T., Kinoshita M. Immunochromatographic assay with improved colored latex. US Patent 5266497A. 1991.
135. Kojima T., Arai M., Sadamoto S., Ikedo M., Yui I. Evaluation of the diagnostic reagents which detect group A Streptococcus with the immunochromatographical method. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi*. 2002, 12(2), 91–95.
136. Ehrlich T. P., Schwartz R. H., Wientzen R., Thorne M. M. Comparison of an immunochromatographic method for rapid identification of group A streptococcal antigen with culture method. *Arch. Fam. Med*. 1993, 2(8), 866–869, DOI: 10.1001/archfami.2.8.866.
137. Yatsyshina S. B., Kulichenko T. V., Artemova I. V., Rybalka O. V., Elkina M. N. Use of immunochromatographic tests in a laboratory diagnostic algorithm for influenza. *Epidemiology and infectious diseases. Current issues*. 2018, 1, 48.
138. Mitamura K., Yamazaki M., Ichikawa M., Kimura K., Kawakami C., Shimizu H., et al. Evaluation of an immunochromatography test using enzyme immunoassay for rapid detection of influenza A and B viruses. *Kansenshogaku Zasshi*. 2004, 78(7), 597–603, DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.78.597.

139. May K. Home tests to monitor fertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991, 165(6Pt2), 2000—2002, DOI: 10.1016/s0002-9378(11)90566-3.
140. Nielsen M. S., Barton S. D., Hatasaka H. H., Stanford J. B. Comparison of several one-step home urinary luteinizing hormone detection test kits to OvumQuick. *Fertil. Steril.* 2001, 76(2), 384—387, DOI: 10.1016/s0015-0282(01)01881-7.
141. Vartdal F., Gaudernack G., Funderud S., Bratlie A., Lea T., Ugelstad J., et al. HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation—a fast and reliable technique. *Tissue Antigens.* 1986, 28(5), 301—312, DOI: 10.1111/j.1399-0039.1986.tb00500.x.
142. Lie O., Vartdal F., Funderud S., Gaudernack G., Olsaker I., Freysadal E., et al. Immunomagnetic isolation of cells for serological BoLA typing. *Anim. Genet.* 1988, 19(2), 75—86.
143. Khramtsov P., Kropaneva M., Byzov I., Minin A., Mysik A., Timganova V., et al. Conjugation of carbon coated-iron nanoparticles with biomolecules for NMR-based assay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019, 176, 256—264, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.009.
144. Khramtsov P., Barkina I., Kropaneva M., Bochkova M., Timganova V., Nechaev A., et al. Magnetic Nanoclusters Coated with Albumin, Casein and Gelatin: Size Tuning, Relaxivity, Stability, Protein Corona, and Application in Nuclear Magnetic Resonance Immunoassay. *Nanomaterials.* 2019, 9, 1345, DOI: 10.3390/nano9091345.
145. Khramtsov P., Kropaneva M., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Solid-phase nuclear magnetic resonance immunoassay for the prostate-specific antigen by using protein-coated magnetic nanoparticles. *Microchim. Acta.* 2019, 186(12), 768, DOI: 10.1007/s00604-019-3925-4.
146. Khramtsov P., Kropaneva M., Bochkova M., Kiselkov D., Timganova V., Zamorina S., et al. Nuclear magnetic resonance immunoassay of tetanus antibodies based on the displacement of magnetic nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* 2021, 413(5), 1461—1471, DOI: 10.1007/s00216-020-03112-7.
147. Mitani K., Une H. Dyed inorganic composite particles bound with immunoreactive substances for use in microtiter tests. *Europ. Pat.* 250700A2. 07.01.88.
148. Nilsson K. G. I. Preparation of nanoparticles conjugated with enzyme and antibody and their use in heterogeneous enzyme immunoassay. *J. Immunol. Meth.* 1989, 122, 273—277, DOI: 10.1016/0022-1759(89)90274-3.
149. Wechers J. H., Van Es R. M., Keiser G. D., Van Doorn A. W. J., Van Gelder W. M. J. Stained sols of non-metallic elements or compounds, their preparation and use. *Europ. Pat.* 89202883.8. 30.05.90.
150. Haun M., Wasi S. Biotinylated antibodies bound to streptavidin beads: a versatile solid matrix for immunoassays. *Analyt. Biochem.* 1990, 191, 337—342, DOI: 10.1016/0003-2697(90)90228-2.
151. Zelikman I., Hjerten S. Protein immunoassay based on agglutination of antibody-coated ferric oxide particles. *J. Immunol. Meth.* 1988, 114, 267—273, DOI: 10.1016/0022-1759(88)90183-4.
152. Hirschfeld T. Dye target reagent. *US Patent* 4166105. 28.08.1979.
153. Tarcha P. J., Wong M., Donovan J. J. Indicator reagents, diagnostic assays and kits employing organic polymer latex particles. *Europ. Patent* 89116594.6. 28.05.1990.
154. Russel J. C., Yang H., Yost D. A. Method for determining sample analyte amount—involves reacting sample with colloidal non-metal particles before optical measurement of analyte-particle complexes. *Europ. Patent* 298368A. 11.01.89.

155. Spallholz J. E. Stable isotopic immunoassay method employing nonradioactive selenium label. US Patent 4341757A. 27.07.82.
156. Van Es R. M., Keiser G. D., Van Doorn A. W. J. Method for an increased visualisation of the reaction product of a specifically binding substance and a corresponding bindable substance, and kit therefore. Europ. Patent 89202884.6. 23.05.90.
157. Wechers J. H., Van Es R. M., Keiser G. D., Van Doorn A. W. J., Van Gelder W. M. J. Stained sols of non-metallic elements or compounds, their preparation and use. Europ. Patent 89202883.8. 30.05.90.
158. Yost D. A., Russel J. C., H. Yang H. Non-metal colloidal particle immunoassay. Europ. Patent 0298368A2. 11.01.89.
159. Gribnau Th. C. J., Roeles F., Leuvers J. H. W. The application of water-dispersible hydrophobic dyes as labels in immunoassays. Europ. Patent 80201241.9. 02.05.85.
160. Snowden K., Hommel M. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. *J. Immunol. Meth.* 1991, 140, 57–65, DOI: 10.1016/0022-1759(91)90126-Z.
161. Xie Y., Xue C., W. Lou W. Establishment and application of dipstick sandwich colloidal dye immunoassay for circulating antigen detection in schistosomiasis patients. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 1999, 17(3), 129–131.
162. Xiang X., Tianping W., Zhigang T. Development of a rapid, sensitive, dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis: a colloidal dye immunofiltration assay. *J. Immunol. Methods*. 2003, 280(1–2), 49–57, DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00196-0.
163. Xiao X., Wang T., Ye H., Qiang G., Wei H., Tian Z. Field evaluation of a rapid, visually-read colloidal dye immunofiltration assay for *Schistosoma japonicum* for screening in areas of low transmission. *Bull. World Health Organ*. 2005, 83(7), 526–533.
164. Adamov A., Agafonov V. Suspension antigens, antibodies and immunosorbents. *Medicine: Moscow*. 1969.
165. Gribnau Th. C. J., Van Sommeren A., Van Dinther F. DIA-disperse dye immunoassay. *Affinity Chromatogr. Biol. Recognit. Proc. Int. Symp.* 1983, 5, 375–380.
166. Anderson R. R. A solid phase system incorporating tetrazolium salts for use in ligand-receptor assays. Europ. Patent 253578A2. 20.01.88.
167. Rounds D. E. Immunoassay utilizing formazan-prelabeled reactants. US Patent 4786589A. 22.11.88.
168. Szewczuk A., Kuropatwa M., Rapak A. The use of antibodies labelled with dyes for fast and simple assay of some human proteins by immunofiltration technique. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1992, 40, 325–329.
169. Kang J., Youn B., Oh Y. H. Carbon black immunochemical label. US Patent 5252496A. 12.10.1993.
170. Van Doorn A. W. J. Immunodetermination using non-metallic labels. Europ. Patent 88202597.6. 21.06.89.
171. Rayev M. B., Ambrosov I. V., Briko N. I. A Novel Method for the Serodiagnosis of Group A Streptococcal Antibodies. *Streptococci and the Host*. Ad. Thea Horaud et al. *Advances in Experimental medicine and biology*. Plenum Press: New York and London. 1997, 418, 327–329.
172. Rayev M., Shmagel K. Carbon-protein covalent conjugates in noninstrumental immunodiagnostic systems. *Journal of Immunological Methods*. 2008, 336, 1, 9–15, DOI: 10.1016/j.jim.2008.03.005.

173. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Dot immunoassay for the simultaneous determination of postvaccination immunity against pertussis, diphtheria, and tetanus. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409(15), 3831–3842, DOI:10.1007/s00216-017-0327-5.

174. Khramtsov P., Kropaneva M., Kalashnikova T., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Highly stable conjugates of carbon nanoparticles with DNA aptamers. *Langmuir*. 2018, 34(35), 10321–10332, DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01255.

175. Kropaneva M., Khramtsov P., Bochkova M., Lazarev S., Kiselkov D., Rayev M. Vertical Flow Immunoassay Based on Carbon Black Nanoparticles for the Detection of IgG against SARS-CoV-2 Spike Protein in Human Serum: Proof-of-Concept. *Biosensors*. 2023, 13, 857, DOI: 10.3390/bios13090857.

176. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M., Kiselkov D. Albumin nanoparticles loaded with hemin as peroxidase mimics for immunoassay. *Chemistry Select*. 2022, 7, 3, e202103892, DOI: 10.1002/slct.202103892.

177. Khramtsov P., Kropaneva M., Bochkova M., Zamorina S., Rayev M., Timganova V., et al. Prussian blue nanozymes with enhanced catalytic activity: size tuning and application in elisa-like immunoassay. *Nanomaterials*. 2022, 12, 10, 1630, DOI: 10.3390/nano12101630.

178. Khramtsov P., Kropaneva M., Bochkova M., Timganova V., Kiselkov D., Zamorina S., et al. Synthesis and Application of Albumin Nanoparticles Loaded with Prussian Blue Nanozymes. *Colloids and Interfaces*. 2022, 6(2), 29, DOI: 10.3390/colloids6020029.

179. Oh Y. K., Joung H. A., Kim S., Kim M. G. Vertical flow immunoassay (VFA) biosensor for a rapid one—step immunoassay. *Electronic Supplementary Material (ESI) The Royal Society of Chemistry. Lab Chip*. 2013, 13, 768–772, DOI: 10.1039/C2LC41016H.

180. Plaksin D., Rayev M., Gromakovskaya E. Method of stereospecific analysis and method of obtaining a conjugate for stereospecific analysis. Patent of the Russian Federation No.2089912 of 10.09.1997. Bulletin “Inventions”. 1997, 25, 336.

The author

Mikhail B. Rayev, Associate Professor, PhD, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences — branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Russia.

ORCID: 0000-0001-6882-4928

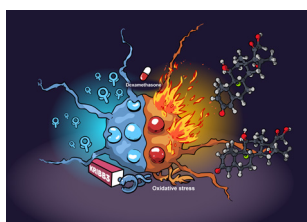
Об авторе

Михаил Борисович Раев, доцент, доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» — филиала Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Россия.

ORCID: 0000-0001-6882-4928

Original research article

ROLE OF HEAT SHOCK PROTEINS 27 AND 70, AND UBIQUITIN IN OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS, AND THE IMPLEMENTATION OF DEXAMETHASONE-INDUCED APOPTOSIS OF JURKAT TUMOR CELLS THE CONDITIONS OF INHIBITED HEAT SHOCK PROTEINS 27

O. L. Nosareva^{1*}, E. A. Stepovaya¹, L. S. Litvinova²,
K. A. Yurova², L. V. Spirina¹¹ Siberian State Medical University,
634050, Tomsk, Moskovsky St., 2, Russia² Immanuel Kant Baltic Federal University,
236041, Kaliningrad, A. Nevsky St., 14, Russia

* Correspondence: olnosareva@yandex.ru

Abstract: Examining the pathogenic aspects of tumor transformation is particularly relevant to understanding the molecular regulation of oxidative modifications in regulatory proteins and effector enzymes involved in apoptosis through their interactions with ubiquitin and heat shock proteins.

This study aims to investigate the molecular mechanisms underlying the involvement of heat shock proteins 27 and 70 and ubiquitin in the oxidative modification of proteins, as well as the execution of dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells under inhibition of heat shock protein 27. It was assessed how 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)isoxazole at a final concentration of 0.1 μ M and/or dexamethasone at a final concentration of 10 μ M affected cytoplasmic exposure of phosphatidylserine followed by annexin V binding, the number of FasL and TNF α receptors, and the reduction of mitochondrial membrane potential in cells. Their effects were also examined with respect to the levels of OH $\cdot$ radicals, free sulfhydryl groups of cysteine in proteins, protein-bound glutathione, oxidized tryptophan residues, bi-tyrosine cross-links, carbonyl derivatives of proteins, ubiquitin, ubiquitin ligase, NF κ B, Apaf-1, and heat shock proteins 27 and 70, as well as caspase-3 activity in Jurkat tumor cells.

The observed changes in the levels of heat shock proteins 27 and 70, ubiquitin, oxidative modifications of amino acid residues, and proteins were associated with the execution of apoptosis in Jurkat tumor cells. When exposed simultaneously to 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole and dexamethasone, Jurkat tumor cells exhibited correlations between the activation of irreversible oxidative modifications and the reduction of reversible oxidative modifications of proteins, associated with the execution of apoptosis involving TNF α and Fas receptors.

The findings indicate that heat shock proteins 27 and 70, together with ubiquitin, participate in both reversible and irreversible oxidative modifications of amino acid residues and proteins, as well as in the execution of dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells when heat shock protein 27 is inhibited.

Keywords: heat shock proteins, ubiquitin, oxidative protein modification, Jurkat tumor cells, apoptosis, dexamethasone, 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole

To cite this article:

Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Litvinova L. S., Yurova K. A., Spirina L. V. Role of heat shock proteins 27 and 70, and ubiquitin in oxidative modification of proteins, and the implementation of dexamethasone-induced apoptosis of jurkat tumor cells the conditions of inhibited heat shock proteins 27. *Advanced targets in Biomedicine*. 2025;1(2):31–41. <https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-2>

Received

22.04.2025

Revised

07.06.2025

Accepted

01.09.2025

Published

08.12.2025

© Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Litvinova L. S., Yurova K. A., Spirina L. V., 2025



Оригинальная исследовательская статья

РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА 27 И 70, УБИКВИТИНА В ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕИНОВ И РЕАЛИЗАЦИИ ДЕКСАМЕТАЗОН-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 27

О. Л. Носарева^{1*}, Е. А. Степовая¹, Л. С. Литвинова²,
К. А. Юрова², Л. В. Спирина¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Россия, Томск

² Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 236041, Россия, Калининград

* Автор-корреспондент: olnosareva@yandex.ru

Резюме: Актуальным в изучении патогенетических аспектов опухолевой трансформации является молекулярное управление окислительной модификацией белков-регуляторов и эффекторных ферментов апоптоза посредством их взаимодействия с убиквитином и протеинами теплового шока. Цель исследования — изучение молекулярных механизмов вклада протеинов теплового шока 27 и 70, убиквитина в окислительную модификацию белковых молекул и реализацию апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat, стимулированного с помощью дексаметазона на фоне ингибирования протеина теплового шока 27. Изучено влияние 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазола в конечной концентрации 0,1 мкМ и/или дексаметазона в конечной концентрации 10 мкМ на цитоплазматическую презентацию фосфатидилсерина с последующим связыванием с аннексином V, количество рецепторов к FasL и TNF α , снижение митохондриального потенциала клеток; на содержание ОН $\bullet$ -радикала, свободных сульфгидрильных групп цистеина в протеинах, белково-связанного глутатиона, окисленных аминокислотных остатков триптофана, битирозиновых сшивок, карбонильных производных белков, убиквитина, убиквитинлигазы, NF κ B, Araf-1, протеинов теплового шока 27 и 70; на активность каспазы-3 опухолевых клеток линии Jurkat. Выявленное изменение содержания протеинов теплового шока 27 и 70, убиквитина, окислительной модификации аминокислотных радикалов и протеинов сопряжено с реализацией апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. В опухолевых клетках линии Jurkat при одновременном воздействии 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазола и дексаметазона доказаны взаимосвязи активации необратимой и снижения обратимой окислительной модификации протеинов с реализацией апоптоза при участии цитоплазматических рецепторов TNF α и Fas. Полученные результаты свидетельствуют об участии протеинов теплового шока 27 и 70, убиквитина в обратимой и необратимой окислительной модификации аминокислотных радикалов и протеинов, реализации стимулированного дексаметазоном апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat на фоне ингибирования белка теплового шока 27.

Ключевые слова: белки теплового шока, убиквитин, окислительная модификация белков, опухолевые клетки Jurkat, апоптоз, дексаметазон, 5-(5-этил-2-гидрокси-4-метоксифенил)-4-(4-метоксифенил)-изоксазол

Для цитирования:

Носарева О. Л., Степовая Е. А., Литвинова Л. С., Юрова К. А., Спирина Л. В. Роль белков теплового шока 27 и 70, убиквитина в окислительной модификации протеинов и реализации дексаметазон-индуцированного апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat в условиях ингибирования белка теплового шока 27. *Задачи биомедицины*. 2025;1(2):31—41. <https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-2>

Поступила
22.04.2025 г.
Прошла рецензирование
07.06.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Носарева О. Л., Степовая Е. А., Литвинова Л. С., Юрова К. А., Спирина Л. В., 2025

Introduction

The malfunctioning of programmed cell death is a crucial contributor to the emergence and advancement of tumors, as well as the development of resistance to chemotherapy [1; 2]. Cancer cells are perpetually exposed to oxidative stress, and heat shock proteins (HSPs) function as molecular chaperones, preventing damage to biomolecules caused by reactive oxygen species within cells [3–7]. The protein refolding process within cells serves as a critical regulator of essential cellular functions, encompassing phenomena such as proliferation, differentiation, and programmed cell death, known as apoptosis [5; 8]. The upregulation of HSPs production in cancer cells may potentially augment their capacity for survival [4; 9–11].

Oxidative stress overactivation in cancer cells leads to activation of molecular mechanisms that inhibit apoptosis, with the functional state of protein molecules playing a crucial role. One molecular mechanism that disrupts apoptosis is the oxidative modification of macromolecules, with proteins playing a crucial role in the initiation, execution, and regulation of programmed cell death in cancer cells [12–14].

Hsp27, Hsp70, and ubiquitin play a critical role in protein folding, refolding, and proteolysis, and also contribute to the regulation of functional activity of both regulatory and effector proteins within intracellular environments, including those involved in cell death processes. The specific role of Hsp27 in apoptosis inhibition is linked to its engagement in the phosphorylation of MEK/ERK signaling cascades and the subsequent inhibition of p53 activity [15; 16]. Furthermore, it has been demonstrated that this HSP contributes to the chemoresistance initiation in the treatment of various cancers, particularly in cases where there is an enhancement in the Hsp27 expression associated with a change in the topoisomerase II activity [16]. The influence of Hsp70 on the inhibition of apoptosis is determined by its interaction with a wide range of molecules, from unfolded to initially folded and aggregated proteins, thereby providing a cytoprotective role. Elevated expression of Hsp70 in tumor cells may promote oncogenesis by enhancing resistance to chemotherapy [17]. Activation of oxidative stress results in a marked increase in the quantity of oxidatively modified proteins in cancer cells, which can alter their functional properties or target them for degradation through ubiquitination. Comprising 76 amino acids, ubiquitin not only directly mediates the covalent modification of proteins (ubiquitination) but is also subject to phosphorylation, acetylation, and other chemical modifications. These modifications play a crucial role in regulating cellular processes, including apoptosis, in eukaryotic organisms [18–20].

In view of the above, it is essential to examine the roles of molecules such as chaperones Hsp27 and Hsp70, along with ubiquitin, in protein oxidation and the induction of apoptosis in cancer cells.

This study aims to elucidate the molecular mechanisms underlying the involvement of heat shock proteins 27 and 70, and ubiquitin, in the oxidative modification of proteins and the execution of dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells under inhibition of heat shock protein 27.

Materials and methods

In order to achieve the objectives of this study, a Jurkat human T-lymphoblastic leukemia cell line obtained from the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg, Russia) was used. Tumor cells were cultured by the suspension method [21], and only cultures exhibiting more than 95 % cell viability were included in the experiments.

To study the Hsp27 role in oxidative modification of proteins and dexamethasone-induced apoptosis, cells were incubated for 18 hours at 37 °C in an atmosphere

containing 5 % CO₂ with the following additives: The Hsp27 inhibitor—5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole (KRIBB3) from Sigma-Aldrich (USA), at a final concentration of 0.1 μM [22] and/or apoptosis inducer, dexamethasone (DEX), (Sigma-Aldrich, USA) at a concentration of 10 μM [21].

After incubation, the cells were rinsed three times with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.4; Amresco, USA) and then used to assess the number of cells displaying cytoplasmic exposure of phosphatidylserine followed by annexin V binding, as well as the expression of FasL and TNFα receptors. Cells exhibiting reduced mitochondrial potential were identified by flow cytometry following the manufacturer's instructions. To assess NFκB, Apaf1, Hsp27, Hsp70, ubiquitin, and ubiquitin ligase content, a cell lysate was prepared using protease inhibitors from Amresco, USA. To determine the concentration of free cysteine sulfhydryl groups in proteins and protein-bound glutathione, cell lysates were deproteinized with a 5 % solution of sulfosalicylic acid from Sigma-Aldrich, USA. To assess the activity of caspase-3 and the content of oxidized tryptophan, bityrosine, carbonyl derivatives of proteins, and OH• radicals, the cell suspension was resuspended in a buffer containing 1 % Triton X-100 from Sigma-Aldrich, USA.

In previous studies [21; 23], a detailed methodology was provided for determining the number of cells positive for annexin V, expressing FasL and TNFα receptors on their cytoplasmic surface, and exhibiting reduced mitochondrial potential. Methods were described for assessing levels of OH• radicals, NFκB, Apaf-1, ubiquitin, ubiquitin ligase, free SH groups in proteins, protein-bound glutathione, oxidized tryptophan, bityrosine, carbonyl derivatives of proteins, total protein content, and caspase-3 activity.

Western blot analysis was employed to measure the content of Hsp27 and Hsp70. Primary monoclonal antibodies specific to the phosphorylated form of Hsp27 (Sigma-Aldrich, USA) were used at a 1:2000 dilution. For Hsp70, antibodies from Sigma-Aldrich (USA) were used at a 1:1000 dilution. For comparative analysis, β-actin, a cytoskeletal protein, served as the control. Data were processed using ImageJ2x software (version 2.1.4.7), developed by Wayne Rasband at the National Institutes of Health (USA).

Statistical analysis was carried out using Statistica 6.0 software for Windows. The Shapiro—Wilk test was applied to assess the normality of data distribution. The results indicated that the data did not follow a normal distribution at a significance level of $p < 0.05$; therefore, the median (Me), first quartile (Q₁) and the third quartile (Q₃) were calculated. To assess the statistical significance of differences between independent samples, the nonparametric Mann—Whitney U test with Bonferroni correction was applied. Correlations between the indicators were evaluated using Spearman's correlation analysis at a significance level of $p < 0.05$.

Results and discussion

Maintaining the balance of cellular processes is essential for cellular health. Using specialized molecular detectors, critical metabolic parameters are carefully controlled and kept within acceptable ranges. These molecules are signaling proteins that change their conformational structure in response to reactive oxygen species. Any factors that disrupt cellular balance trigger internal mechanisms designed to restore the equilibrium of biochemical processes within the cell [5].

Tumor cells exhibit excessive proliferation, disrupted differentiation, and defective apoptosis regulation. Therefore, there is an urgent need to investigate their metabolism at the molecular level. Heat shock proteins offer promising molecular targets for developing technologies that can regulate apoptosis in tumor cells [15; 24].

Establishing the relationships between the levels of Hsp27, Hsp70, and ubiquitin, oxidatively modified proteins and amino acid residues, and apoptosis in Jurkat tumor cells treated with 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole and dexamethasone had scientific relevance.

The role of Hsp27 is linked to oxidative stress and activation of oxidation modifications of proteins and amino acid residues, as revealed by our study of dexamethasone-mediated apoptosis induction in the Jurkat cell line. When combined, DEX and KRIBB3 increased the levels of OH[•] radicals by 551.5 % ($p < 0.05$) compared to untreated cells (523.00 [415.10–719.37] nmol/mg protein). Additionally, in this group, a decrease of 85.7 % ($p < 0.05$) was observed in the concentration of free sulfhydryl groups in cysteine residues of proteins compared to the levels in the intact group (Fig. 1). A rise in intracellular concentration of hydroxyl radicals was accompanied by oxidative modifications of proteins. Specifically, simultaneous administration of DEX and KRIBB3 resulted in a significant 207.3 % increase ($p < 0.05$) in protein carbonyl content, accompanied by a 31 % decrease ($p < 0.05$) in protein-bound glutathione. Moreover, ubiquitin levels were reduced by 24.6 % ($p < 0.05$) compared to untreated cells (Fig. 1, 2). The levels of oxidized amino acid, such as tryptophan, bityrosine and ubiquitin ligase were comparable to those observed in the intact cell group. Thus, the simultaneous addition of DEX and KRIBB3 resulted in a significant increase in the number of annexin-positive cells by 1165.4 % ($p < 0.05$), cells with reduced mitochondrial potential by 302.5 % ($p < 0.05$), Fas-positive cells by 1844.2 % ($p < 0.05$), and TNF RI-positive cells by 676.8 % ($p < 0.05$). NF κ B levels increased by 131.5 % ($p < 0.05$) and caspase-3 activity by 319.7 % ($p < 0.05$), while Apaf-1 concentration decreased by 46.6 % ($p < 0.05$). The levels of Hsp27 and Hsp70 were comparable to those observed in the intact cell group (Fig. 2, 3).

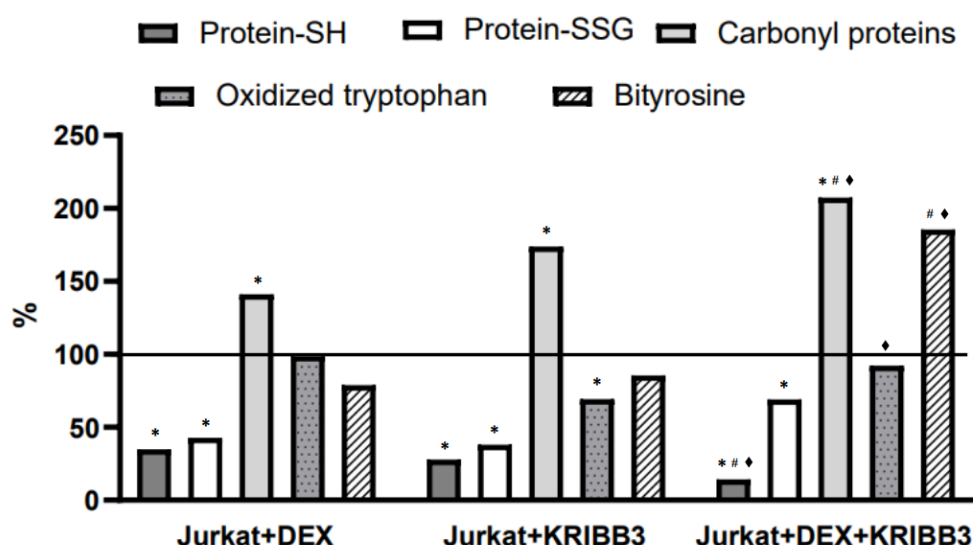


Fig. 1. Influence of the heat shock protein 27 inhibitor on indicators of oxidative modification of proteins and amino acids during dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells, %

Note: DEX stands for dexamethasone; KRIBB3, 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole; Protein-SH, free SH groups of protein; Protein-SSG, protein-bound glutathione; Carbonyl proteins, protein carbonyl derivatives; Oxidized tryptophan, oxidized tryptophan residues; Bityrosine, dityrosine; * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the intact Jurkat group; # indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + DEX group; ♦ indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + KRIBB3 group. The sample size is 5. Values for the intact Jurkat group were set at 100 % (protein-SH content: 1.26 [1.08–1.34] nmol/mg protein; protein-SSG content: 0.42 [0.40–0.57] nmol/mg protein; protein carbonyl derivative content: 0.382 [0.379–0.388] nmol/mg protein; oxidized tryptophan content: 25.19 [22.14–38.30] units/mg protein; dityrosine content: 0.76 [0.51–1.52] units/mg protein).

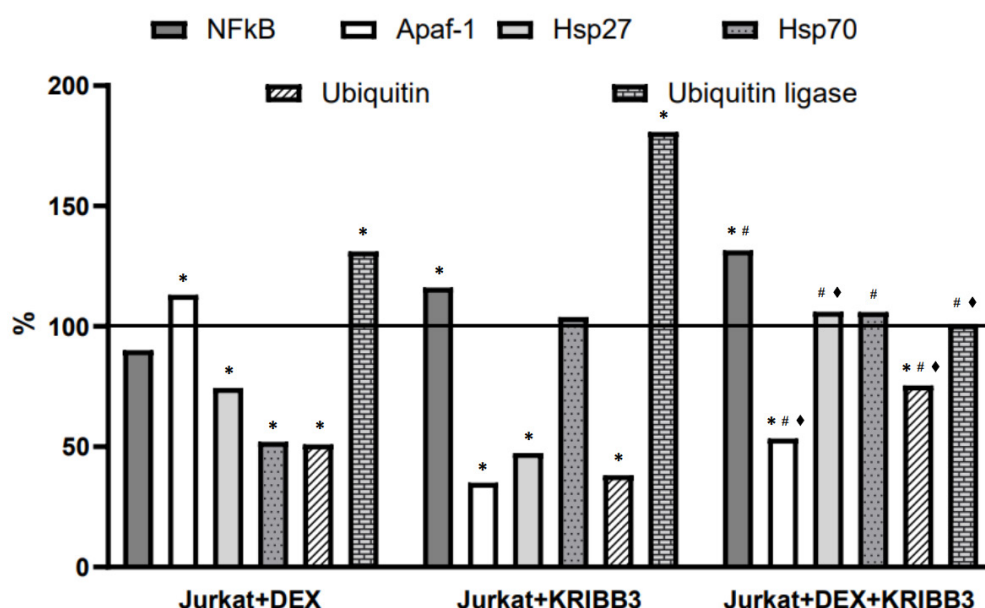


Fig. 2. Influence of the heat shock protein 27 inhibitor on the levels of NFκB, Apaf-1, ubiquitin, ubiquitin ligase, and heat shock proteins 27 and 70 during dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells, %

Note: DEX, dexamethasone; KRIBB3, 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole; Hsp27, heat shock protein 27; Hsp70, heat shock protein 70; Ubiquitin, ubiquitin; Ubiquitin ligase, ubiquitin ligase. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the intact Jurkat group; # indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + DEX group; ♦ indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + KRIBB3 group. The sample size 5. Values for the intact Jurkat group were set at 100 % (NFκB: 3.106 [3.095–3.128] units; Apaf-1: 1.884 [1.856–1.917] units; Hsp27: 2.890 [2.340–2.993] units; Hsp70: 4.614 [4.416–4.710] units; ubiquitin: 3.177 [3.099–3.412] units; ubiquitin ligase: 1.672 [1.588–1.711] units).

One of the most reactive oxidative species is the hydroxyl radical, which can produce radical protein compounds through the involvement of amino acid radicals, such as tyrosine, tryptophan, histidine, and phenylalanine. In tumor cells, elevated levels of protein carbonyl derivatives indicate irreversible oxidative damage to proteins. Yet, cysteine residues in amino acids can undergo reversible oxidative modification, followed by changes in their functional activity. The findings suggest that Hsp27, Hsp70, and ubiquitin are involved in initiating these oxidative changes and facilitating irreversible protein degradation. Effector and regulatory proteins of apoptosis act as targets during this process.

Tumor cells respond to both internal and external environmental factors by controlling the rate and direction of intracellular processes through changes in protein content and activity. These alterations in protein functional states enable the cell to rapidly respond to stimuli during the early stages of exposure. This process depends on post-translational protein modifications, with chaperones playing a critical role in their regulation [7; 24]. Carbonylation, ubiquitination, glutathionylation, phosphorylation, acetylation, nitrosylation, and glycosylation are chemical reactions that modify amino acid side chains, resulting in changes to protein structure and function [25]. To sustain their metabolic processes and ensure survival, tumor cells must undergo substantial metabolic alterations, which require a high concentration of chaperones activated in response to oxidative stress. Therefore, heat shock proteins, a specific class of molecular chaperones, may contribute to cancer development [15].

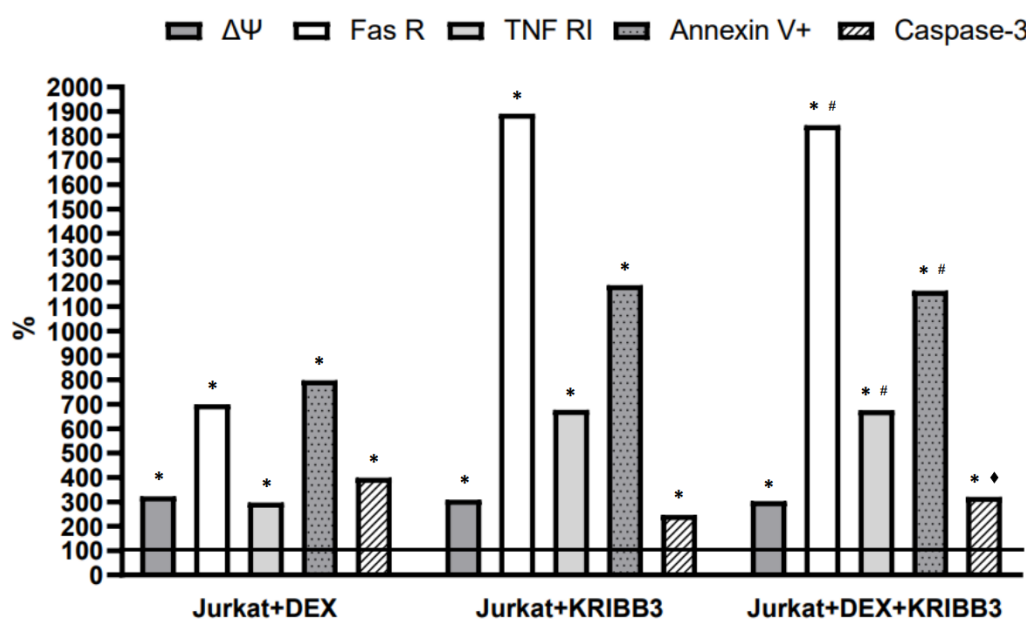


Fig. 3. Influence of the heat shock protein 27 inhibitor on apoptosis-related indicators during dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat tumor cells, %

Note: DEX, dexamethasone; KRIBB3, 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole; $\Delta\Psi$, cells with reduced mitochondrial potential; Fas R, Fas-positive cells; TNF RI, TNF RI-positive cells; Annexin V⁺, annexin-positive cells; Caspase-3, caspase-3. * indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the intact Jurkat group; # indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + DEX group; ♦ indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) compared to the Jurkat + KRIBB3 group. The sample size is 5. Values for the intact Jurkat group were set at 100 % (cells with reduced mitochondrial potential $\Delta\Psi$: 18.00 [15.10–19.00] %; Fas-positive cells: 4.30 [2.12–8.90] %; TNF RI-positive cells: 9.56 [7.32–14.20] %; annexin-positive cells: 5.20 [4.00–5.60] %; caspase-3 activity: 36.58 [22.66–43.89] pmol/min $\times$ mg protein).

Analysis of Jurkat tumor cells treated simultaneously with DEX and KRIBB3 revealed a significant 129.4 % increase in caspase-3 activity ($p < 0.05$). Apaf-1 levels increased by 152.7 % ($p < 0.05$), protein carbonyl derivatives by 119.3 % ($p < 0.05$), oxidized tryptophan by 133 % ($p < 0.05$), bi-tyrosine by 216.9 % ($p < 0.05$), Hsp27 by 223.5 % ($p < 0.05$), and ubiquitin by 197.8 % ($p < 0.05$), whereas free sulfhydryl groups decreased by 48.6 % ($p < 0.05$) and ubiquitin ligase by 44.2 % ($p < 0.05$). Compared to the group cultured with the Hsp27 inhibitor alone, decreases were observed in the number of annexin-, Fas-, and TNF RI-positive cells, cells with reduced mitochondrial potential, NF κ B and hydroxyl radical levels, protein-bound glutathione, and Hsp70 (Fig. 1–3).

Simultaneous exposure of Jurkat tumor cells to DEX and KRIBB3 in the incubation medium resulted in a significant increase in annexin-positive cells by 146 % ($p < 0.05$), Fas-positive cells by 263.5 % ($p < 0.05$), TNF RI-positive cells by 227.4 % ($p < 0.05$), and NF κ B by 146 % ($p < 0.05$). In addition, levels of hydroxyl radicals increased by 170.8 % ($p < 0.05$), protein carbonyl derivatives by 146.9 % ($p < 0.05$), bi-tyrosine by 235 % ($p < 0.05$), Hsp27 by 142.4 % ($p < 0.05$), Hsp70 by 203.7 % ($p < 0.05$), and ubiquitin by 147.8 % ($p < 0.05$). Moreover, in the cell group cultured with the apoptosis inducer alone, Apaf-1 levels decreased by 52.7 % ($p < 0.05$), free protein SH groups by 59.1 %

($p < 0.05$), and ubiquitin ligase by 23.1 % ($p < 0.05$), while caspase-3 activity, the number of cells with reduced mitochondrial potential, and levels of protein-bound glutathione and oxidized tryptophan remained comparable (Fig. 1–3).

Dexamethasone alone induces apoptosis in Jurkat tumor cells by activating both receptor-mediated and mitochondrial pathways. This process is accompanied by the accumulation of oxidatively modified proteins, as evidenced by positive correlations:

- between oxidized tryptophan levels and the proportion of Fas-positive cells ($r = +0.89$, $p < 0.05$);

- between oxidized tryptophan levels and Apaf-1 expression ($r = +0.89$, $p < 0.05$).

When the heat shock protein 27 inhibitor KRIBB3 is added to the culture medium of Jurkat tumor cells, a negative correlation is observed between bi-tyrosine content and NF- κ B expression ($r = -0.94$, $p < 0.05$).

Under the combined treatment of dexamethasone (apoptosis inducer) and KRIBB3 (Hsp27 inhibitor) in Jurkat cells, the following correlations were identified:

- between TNF RI-positive cell numbers and protein-bound glutathione levels ($r = -0.94$, $p < 0.05$);

- between bi-tyrosine content and oxidized tryptophan ($r = +0.89$, $p < 0.05$).

The results indicate that Hsp27 inhibition markedly enhances apoptosis induction via the receptor pathway under DEX treatment, highlighting a key role for Hsp27 in both irreversible and reversible oxidative modifications of apoptotic proteins, Fas receptors, and TNF RI.

Conclusions

The study demonstrated that the combined treatment of Jurkat tumor cells with 5-(5-ethyl-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-isoxazole and dexamethasone alters the levels of Hsp27, Hsp70, and ubiquitin, and induces oxidative stress, as evidenced by increased hydroxyl radicals along with elevated bi-tyrosine, protein carbonyl derivatives, and oxidized tryptophan. In addition, protein-bound glutathione levels decrease. These findings suggest an increase in irreversible protein modifications and a decrease in reversible modifications. Thus, inhibition of Hsp27 with KRIBB3 combined with apoptosis induction by DEX revealed the molecular mechanisms through which Hsp27, Hsp70, and ubiquitin predominantly modulate the receptor-mediated apoptosis pathway in Jurkat tumor cells, involving oxidatively modified proteins.

Funding. The study was conducted without external funding.

Conflict of interest. The authors declare absence of the conflict of interest.

Финансирование. Исследование проводилось без внешнего финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Pistritto G., Trisciuglio D., Ceci C., Garufi A., D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* (Albany NY). 2016, 8(4), 603–619, DOI: 10.18632/aging.100934.
2. Kulbay M., Paimboeuf A., Ozdemir D., Bernier J. Review of cancer cell resistance mechanisms to apoptosis and actual targeted therapies. *Journal of cellular biochemistry*. 2022, 123(11), 1736–1761, DOI: 10.1002/jcb.30173.

3. Hayes J. D., Dinkova-Kostova A. T., Tew K. D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020, 38(2), 167–197, DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
4. Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. *Trends in pharmacological sciences*. 2017, 38(3), 226–256, DOI: 10.1016/j.tips.2016.11.009.
5. Ahmed K., Zaidi S. F., Mati-Ur-Rehman, Rehman R., Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: Cytoprotection and cell death. *Journal of thermal biology*. 2020, 91, 102615, DOI: 10.1016/j.jtherbio.2020.102615.
6. Szyller J., Bil-Lula I. Heat Shock Proteins in Oxidative Stress and Ischemia/Reperfusion Injury and Benefits from Physical Exercises: A Review to the Current Knowledge. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021, 2021, 6678457, DOI: 10.1155/2021/6678457.
7. Lang B. J., Prince T. L., Okusha Y., Bunch H., Calderwood S. K. Heat shock proteins in cell signaling and cancer. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*. 2022, 1869(3), 119187, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.119187.
8. Takakuwa J. E., Nitika, Knighton L. E., Truman A. W. Oligomerization of Hsp70: Current Perspectives on Regulation and Function. *Frontiers in molecular biosciences*. 2019, 6, 81, DOI: 10.3389/fmolb.2019.00081.
9. Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Ryazantseva N. V., Zakirova E. V., Mazunin I. O., Litvinova L. S. et al. Disruption of Expression of mRNA Hsp27 and Ubiquitin as a Mechanism of Escaping from Apoptosis of Jurkat Line Tumor Cells. *Bulletin of Siberian medicine*. 2015, 14(1), 66–72, DOI: 10.20538/1682-0363-2015-1-66-72.
10. Saini J., Sharma P. K. Clinical, Prognostic and Therapeutic Significance of Heat Shock Proteins in Cancer. *Current drug targets*. 2018, 19(13), 1478–1490, DOI: 10.2174/138945011866617082312124.
11. Boliukh I., Rombel-Bryzek A., Żuk O., Radecka B. The role of heat shock proteins in neoplastic processes and the research on their importance in the diagnosis and treatment of cancer. *Contemporary oncology (Poznań, Poland)*. 2021, 25(2), 73–79, DOI: 10.5114/wo.2021.106006.
12. Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Shakhristova E. V., Alekseeva O. N., Kuzmenko D. I., Sadykova A. A. et al. The role of redox status and oxidative modification of proteins in implementing apoptosis in human blood lymphocytes in norm and under experimental oxidative stress. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni I. M. Sechenova*. 2019, 105(3), 327–338, DOI: 10.1134/S0869813919030063.
13. Dilek O. Current Probes for Imaging Carbonylation in Cellular Systems and Their Relevance to Progression of Diseases. *Technology in cancer research & treatment*. 2022, 21, 15330338221137303, DOI: 10.1177/15330338221137303.
14. Wang H., Yang L., Liu M., Luo J. Protein post-translational modifications in the regulation of cancer hallmarks. *Cancer gene therapy*. 2023, 30(4), 529–547, DOI: 10.1038/s41417-022-00464-3.
15. Regimbeau M., Abrey J., Vautrot V., Causse S., Gobbo J., Garrido C. Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics. *Seminars in cancer biology*. 2022, 86(Pt 1), 46–57, DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.07.014.
16. Lampros M., Vlachos N., Voulgaris S., Alexiou G. A. The Role of Hsp27 in Chemotherapy Resistance. *Biomedicines*. 2022, 10(4), 897, DOI: 10.3390/biomedicines10040897.
17. Kumar S., Stokes J., Singh U. P., Scissum Gunn K., Acharya A., Manne U. et al. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*. 2016, 374(1), 156–166, DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.056.

18. Swatek K. N., Komander D. Ubiquitin modifications. *Cell research*. 2016, 26(4), 399–422, DOI: 10.1038/cr.2016.39.
19. Song L., Luo Z. Q. Post-translational regulation of ubiquitin signaling. *The Journal of cell biology*. 2019, 218(6), 1776–1786, DOI: 10.1083/jcb.201902074.
20. Dikic I., Schulman B. A. An expanded lexicon for the ubiquitin code. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2023, 24(4), 273–287, DOI: 10.1038/s41580-022-00543-1.
21. Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Ryazantseva N. V., Shakhristova E. V., Orlov D. S., Novitsky V. V. The role of ubiquitin in regulation of apoptosis in Jurkat cells. *Bulletin of Siberian medicine*. 2018, 17(3), 96–104, DOI: 10.20538/1682-0363-2018-3-96-104.
22. Ryazantseva N. V., Stepovaya E. A., Nosareva O. L., Konovalova E. V., Orlov D. S., Naumova A. I. et al. Role of heat shock protein 27 in regulation of glutathione system and apoptosis of Jurkat tumor cells and blood lymphocytes. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2014, 158(9), 366–369, DOI: 10.1007/s10517-015-2766-3.
23. Nosareva O. L., Stepovaya E. A., Ryazantseva N. V., Shakhristova E. V., Egorova M. Y., Novitsky V. V. The Role of the Glutathione System in Oxidative Modification of Proteins and Dysregulation of Apoptosis in Jurkat Tumor Cells. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017, 164(8), 228–231, DOI: 10.1007/s10517-017-3957-x.
24. Kurop M. K., Huyen C. M., Kelly J. H., Blagg B. S. J. The heat shock response and small molecule regulators. *European journal of medicinal chemistry*. 2021, 226, 113846, DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113846.
25. Dubinina E. E. Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). *Physiological, clinical and biochemical aspects*. Medical Press: St. Petersburg. 2006, ISBN 5-85474-072-9.

The authors

Olga L. Nosareva, Associate Professor, Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Biochemistry and Molecular Biology with a course in Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-7441-5554

Elena A. Stepovaya, Professor, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with a course in Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0001-9339-6304

Larisa S. Litvinova, Associate Professor, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Fundamental Medicine and Director of the Center for Immunology and Cellular Biotechnology of the Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

ORCID: 0000-0001-5231-6910

Kristina A. Yurova, Doctor of Medical Sciences, Senior Researcher of the Center for Immunology and Cellular Biotechnology of the Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.

Ludmila V. Spirina, Associate Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with a course in Clinical Laboratory Diagnostics, Siberian State Medical University, Russia.

ORCID: 0000-0002-5269-736X

Об авторах

Ольга Леонидовна Носарева, доцент, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-7441-5554

Елена Алексеевна Степовая, профессор, доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0001-9339-6304

Лариса Сергеевна Литвинова, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фундаментальной медицины и директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

ORCID: 0000-0001-5231-6910

Кристина Алексеевна Юрова, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

ORCID: 0000-0001-6146-3330

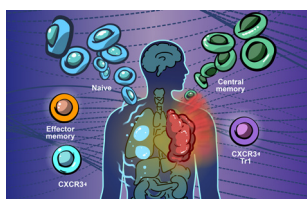
Людмила Викторовна Спирина, доцент, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, Сибирский государственный медицинский университет, Россия.

ORCID: 0000-0002-5269-736X

Оригинальная исследовательская статья

НАРУШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ АКСИАЛЬНОМ СПОНДИЛОАРТРИТЕ

И. А. Артемьев¹, А. Д. Акино¹, И. И. Дрейзис¹, П. В. Тирикова¹,
Р. Д. Дунаева¹, Е. В. Центр¹, А. А. Рубинштейн¹, А. С. Головкин¹,
И. В. Кудрявцев^{1,*}, А. Л. Маслянский^{1, 2, 3}



¹ Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, 197341, Россия, Санкт-Петербург

² Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой, 115522, Россия, Москва

³ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Россия, Санкт-Петербург

* Автор-корреспондент: igor.v.kudryavtsev@gmail.com

Для цитирования:

Артемьев И. А., Акино А. Д., Дрейзис И. И., Тирикова П. В., Дунаева Р. Д., Центр Е. В., Рубинштейн А. А., Головкин А. С., Кудрявцев И. В., Маслянский А. Л. Нарушения субпопуляционного состава регуляторных Т-лимфоцитов периферической крови при аксиальном спондилоартрите. *Современные направления в биомедицине*. 2025;1(2):42–57. <https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-3>

Поступила
30.05.2025 г.
Прошла рецензирование
15.07.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Артемьев И. А., Акино А. Д., Дрейзис И. И., Тирикова П. В., Дунаева Р. Д., Центр Е. В., Рубинштейн А. А., Головкин А. С., Кудрявцев И. В., Маслянский А. Л., 2025

Резюме: Аксиальный спондилоартрит (AxSpA) является хроническим воспалительным заболеванием опорно-двигательного аппарата, относится к группе спондилоартритов и характеризуется обязательным вовлечением в патологический процесс крестцово-подвздошных сочленений и/или осевого скелета. В рамках проведенного исследования были получены образцы периферической крови от 32 пациентов с AxSpA и 29 условно здоровых добровольцев. В этих образцах при помощи методов многоцветной проточной цитометрии был проведен анализ субпопуляционного состава регуляторных Т-клеток (Treg). Было показано, что относительное и абсолютное содержание «наивных» Tregs у пациентов было снижено относительно значений контроля, тогда как относительное и абсолютное содержание клеток центральной и эффекторной памяти (СМ и ЕМ с фенотипами CD62L + CD45RA – и CD62L – CD45RA – соответственно) было повышено. Кроме того, при AxSpA имело место увеличение как относительного, так и абсолютного содержания CXCR5 – CXCR3 + CCR6 – Tr1, а также отмечалось увеличение концентрации клеток CXCR5 – CXCR3 – CCR6 – Tr2, CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + Tr17 и CXCR5 – CXCR3 + CCR6 + Tr17.1. Доля клеток Tr1 возрастала исключительно в рамках СМ Tregs, тогда как содержание Tr2 увеличивалось, а Tr17 уменьшалась среди СМ и ЕМ Treg у пациентов с AxSpA. При этом уровень CXCR5 + фолликулярных клеток Tregs достоверно не изменялся. Дальнейшие исследования необходимы для понимания роли отдельных субпопуляций Tregs в патогенезе AxSpA, которые можно рассматривать в качестве перспективных маркеров для диагностики и потенциальных мишеней для терапии данного заболевания.

Ключевые слова: аксиальный спондилоартрит, проточная цитометрия, регуляторные Т-лимфоциты, дифференцировка Т-клеток, хемокиновые рецепторы, CXCR3, Tr1



Original research article

ALTERATIONS IN PERIPHERAL BLOOD REGULATORY T CELL SUBSETS IN PATIENTS SUFFERING FROM AXIAL SPONDYLOARTHRITIS

I. A. Artemiev¹, A. D. Aquino¹, I. I. Dreizis¹, P. B. Tirikova¹,
R. D. Dynaeva¹, E. V. Centr¹, A. A. Rubinstein¹, A. S. Golovkin¹,
I. V. Kudryavtsev^{1,*}, A. L. Maslyanskiy^{1,2,3}

¹ Almazov National Medical Research Centre,
197341, St. Petersburg, Russia

² V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology,
115522, Moscow, Russia

³ Saint Petersburg State University,
199034, St. Petersburg, Russia

* Correspondence: igor.v.kudryavtsev@gmail.com

To cite this article:

Artemiev I. A., Aquino A. D.,
Dreizis I. I., Tirikova P. B.,
Dynaeva R. D., Centr E. V.,
Rubinstein A. A., Golovkin A. S.,
Kudryavtsev I. V., Maslyanskiy A. L.
Alterations in peripheral blood regula-
tory T cell subsets in patients suffering
from axial spondyloarthritis. *Advanced
targets in Biomedicine*. 2025;1(2):42–57.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-3>

Received
30.05.2025

Revised
15.07.2025

Accepted
01.09.2025

Published
08.12.2025

©Artemiev I. A., Aquino A. D.,
Dreizis I. I., Tirikova P. B.,
Dynaeva R. D., Centr E. V.,
Rubinstein A. A., Golovkin A. S.,
Kudryavtsev I. V., Maslyanskiy A. L.,
2025

Abstract: Axial spondyloarthritis (AxSpA) is a chronic inflammatory disorder of the musculoskeletal system that belongs to the group of spondyloarthritis, characterized by the obligatory involvement of the sacroiliac joints and/or axial skeleton in the pathological process. In this study, we collected peripheral blood samples from 32 AxSpA patients and 29 healthy controls (HC), and investigated the regulatory T cell (Tregs) subsets by multicolor flow cytometry. We noticed that the relative numbers of 'naïve' Tregs were decreased, while the relative and absolute numbers of central and effector memory Tregs (CM and EM) were CD62L + CD45RA – and CD62L – CD45RA –, respectively) were elevated in patients with AxSpA. Next, in AxSpA patients CXCR5 – CXCR3 + CCR6 – Tr1 cells were increased both in relative and absolute frequencies. The absolute numbers of CXCR5 – CXCR3 – CCR6 – Tr2, CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + Tr17, and CXCR5 – CXCR3 + CCR6 + Tr17.1 were also elevated in patients with AxSpA vs. HC group. Finally, in patients with AxSpA Tr1 were increased exclusively within CM Tregs, while Tr2 cells were elevated both within CM and EM Treg subsets. Tr17 cells were decreased both within CM and EM Treg subsets. Interestingly, we found no significant differences in CXCR5+ follicular Tregs between the groups. Further investigations of circulating Tregs will contribute to find new targets and therapies in AxSpA.

Keywords: axial spondyloarthritis, flow cytometry, regulatory T cells, T cell maturation, chemokine receptors, CXCR3, Tr1

Введение

Аксиальный спондилоартрит (AxSpA) — хроническое воспалительное заболевание опорно-двигательного аппарата, относится к группе спондилоартритов и характеризуется обязательным вовлечением в патологический процесс крестцово-подвздошных сочленений и/или осевого скелета, диагноз которого устанавливается на основании классификационных критериев ASAS 2009 г. [1]. Характерным для AxSpA является развитие широкого спектра системных (вне-суставных) поражений различных органов и систем: увеитов, воспалительных заболеваний кишечника, поражений сердца (преимущественно нарушения атрио-вентрикулярного проведения), легких (интерстициального заболевания легких), кожи (псориаза), костей (остеопороз) и почек (IgA нефропатия) [2]. Согласно современным представлениям AxSpA необходимо рассматривать как заболевание смешанного (с участием как аутоиммунных, так и аутовоспалительных патогенетических механизмов) спектра, относимого к группе МНС-I опатий [3]. Сильная ассоциация данного заболевания с аллелем HLA-B27 главного комплекса гистосовместимости, аккумуляция в пораженных тканях TRBV9 + Т-лимфоцитов указывают на непосредственное участие Т-клеток в его патогенезе [4].

Кроме того, большое количество исследований показало ключевую роль цитокинов семейства IL-17 в формировании патологического процесса при AxSpA [5]. Однако все еще ведутся споры относительно ключевых иммунокомпетентных клеток, продуцирующих эти цитокины: одни исследователи считают, что клетки миелоидного ряда являются основными IL-17-секретирующими, другие же отдают предпочтение клеткам системы адаптивного иммунитета [6; 7]. Несмотря на продолжающиеся споры вокруг превалирующего патогенетического механизма, лежащего в основе развития заболевания, нельзя игнорировать роль 3-го типа иммунного ответа при AxSp A. Участниками этого типа иммунного ответа выступают клетки как врожденного, так и приобретенного иммунитета.

Для ограничения аутоиммунного воспаления, индуцированного Т-лимфоцитами и другими эффекторными клетками, необходимо супрессивное действие регуляторного звена иммунитета. Одними из клеток, обладающих способностью к регуляции воспаления как на местном, так и на системном уровнях, являются регуляторные Т-клетки (Treg). При AxSpA динамика этих лимфоцитов в периферической крови остается не полностью изученной. Различные группы исследователей при изучении Treg получили противоречивые результаты. Так, Cao и соавт. отметили снижение Т-лимфоцитов с фенотипом CD25brightCD4+ в периферической крови пациентов с AxSpA [8], тогда как Liao и соавт. наблюдали повышение Tregs в циркуляции у пациентов с анкилозирующим спондилитом [9]. Несмотря на выявленные противоречия, было доказано, что Т-клетки с фенотипом CD4+CD25bright при активном AxSpA мигрируют в воспаленные суставы [8]. Возможно, их миграция носит компенсаторный характер, запускающийся при развитии аутоиммунного воспаления. Некоторые исследователи отмечали нарушение функции Treg при AxSp A. Так, Wang и соавт. отметили снижение экспрессии Tim-3 клетками с фенотипом CD3+CD4+CD25+Foxp3+CD127-. Кроме того, эти Treg у пациентов с AxSpA имели сниженный уровень экспрессии Foxp3, что негативно влияло на супрессивные способности этих клеток [10]. После успешного лечения и подавления активности AxSpA кластер Tregs начинал высоко экспрессировать молекулы CTLA4, TGFB1, CD25 и CD279 [11], что отражало восстановление функции этих клеток при успешной терапии.

Таким образом, анализ динамики регуляторных Т-клеток в периферической крови пациентов с AxSpA может помочь в оценке активности основного заболевания, а также в прогнозировании исхода патологии.

Материалы и методы

В исследование включено 32 пациента с рентгенологическим AxSpA, или анкилозирующим спондилитом (АС), диагностированным на основании Нью-Йоркских критериев 1984 г., и нерентгенологическим AxSpA, установленным согласно критериям ASAS 2009 г. Критериями невключения были онкологические заболевания, иммунодефицитные состояния, наличие острых либо хронических инфекций (в стадии обострения), наличие других зарегистрированных аутоиммунных или аутовоспалительных заболеваний. Подробная характеристика группы пациентов изложена в таблице 1. В ходе исследования оценивалась активность AxSpA посредством композитных индексов BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) и ASDAS (Axial Spondyloarthritis Disease Activity Score). Кроме того, пациентам проводился подсчет числа болезненных суставов (ЧБС) из 68 проанализированных суставов, числа припухших суставов (ЧПС) из 66 проанализированных суставов, а также исследование количества энтезитов — воспалительно измененных мест прикрепления связок и сухожилий к костям — на основе валидированных индексов энтезитов MASES (Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score) и SPARCC (Spondyloarthritis Research Consortium of Canada). Также у пациентов исследовались уровни маркеров системного воспаления: скорость оседания эритроцитов (СОЭ) в мм/ч и С-реактивный белок (СРБ) в мг/мл.

Таблица 1

Сводная характеристика группы пациентов

Table 1

Characteristics of patients with axial spondyloarthritis

Показатель	Значение
Средний возраст	45,5 ± 10,5 лет
Активность на основании индекса BASDAI	5,10 ± 2,13
Активность на основании индекса ASDAS	3,75 ± 1,29
Индекс энтезитов MASES	2,37 ± 2,89,
Индекс энтезитов SPARCC	1,70 ± 2,58
Число болезненных суставов (ЧБС) из 68	6,27 ± 10,37
Число припухших суставов (ЧПС) из 66	0,43 ± 0,97

В качестве контрольной группы использовалась периферическая венозная кровь условно здоровых доноров (n = 29), сопоставимых по полу и возрасту с больными AxSP A. Все исследования были проведены после добровольного информированного согласия испытуемых, а также в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Работа была одобрена Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России (протокол № 03-20 от 16 марта 2020 г.).

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с содержанием КЗЭДТА, а также в пробирки с активатором свертывания — диоксидом кремния. До проведения цитометрического учета полученные образцы крови хранились не более 6 ч при комнатной температуре (20—22 °C). Подготовку образцов для анализа проводили по стандартной процедуре с использованием комплекта из

9 моноклональных антител (все антитела производства BioLegend Inc., США). С целью выявления регуляторных Т-клеток использовали антитела против CD3 (клон ОКТ3, флуорохром APC/Сy7, кат. № 317342), CD4 (клон ОКТ4, флуорохром Pacific Blue, кат. № 317429) и CD25 (клон BC96, флуорохром PE/Dazzle™ 594, кат. № 328819). В рамках общего пула лимфоцитов регуляторные Т-клетки (Treg) выявляли как CD3 + CD4 + CD25bright. Для разделения Treg клеток на основные стадии созревания применяли антитела против CD45RA (клон HI100, флуорохром FITC, кат. № 304106) и CD62L (клон DREG-56, флуорохром PE, кат. № 304806), выявляя популяции «наивных» клеток (CD45RA + CD62L +), а также клеток центральной и эффекторной памяти (CD45RA – CD62L + и CD45RA – CD62L –, соответственно). Для выявления основных «поляризованных» популяций Treg использовали антитела против CXCR5 (клон J252D4, флуорохром PerCP/Сy5.5, кат. № 356910), CXCR3 (клон G025H7, флуорохром APC, кат. № 353712), CCR4 (клон L291H4, флуорохром Brilliant Violet 510, кат. № 359416) и CCR6 (клон G034E3, флуорохром PE/Сy7, кат. № 353418). Так, на основании анализа экспрессии хемокиновых рецепторов общий пул Tregs был разделен на отдельные субпопуляции, в том числе CXCR5 + фолликулярные регуляторные Т-клетки (Tfr), а также 4 подтипа CXCR5 – Tregs, включая Tr1 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –, Tr2 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –, Tr17 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + и Tr17.1 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +, как это было предложено ранее [12; 13]. Окраску антителами производили с учетом рекомендаций производителя. После окраски клеток антителами осуществляли удаление эритроцитов, применяя коммерческий лизирующий раствор VersaLyse (Beckman Coulter, США), после чего образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора (300 г 7 мин), надосадов декантировали. Клеточный осадок ресуспендировали в нейтральном 2 %-ном растворе параформальдегида (Sigma-Aldrich, США), приготовленном на основе физиологического раствора (pH 7,2–7,4). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. В каждом образце анализировалось не менее 40000 CD4 + Т-клеток периферической крови.

Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи пакета программ Kaluza™ v.2.0 (Beckman Coulter, США). Алгоритм выявления ключевых популяций Treg был описан детально ранее [14]. Для получения абсолютных значений по исследуемым популяциям Treg клеток использовали данные клинического анализа крови. Определение концентрации СРБ проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы Abbott Diagnostics Technologies AS, а исследование СОЭ – по методу Вестергрена.

Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Результаты выражали в виде % позитивных клеток от искомой популяции, приводили в виде медианы и интерквартильного размаха (25 %; 75 %). Для оценки достоверности различий использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни.

Результаты

При анализе основных популяций Т-клеток, включая CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, а также регуляторные Т-клетки (Tregs), отмечено незначительное увеличение абсолютного содержания CD4+ Т-клеток у пациентов с AxSpA при сравнении с группой контроля (953 кл/1μL (694; 1170) против 758 кл/1μL (679; 924) при $p = 0,049$). В случае Treg достоверных различий как по относитель-

ному (2,35 % (1,87; 3,10) против 2,42 % (1,97; 2,75) при $p = 0,583$), так и по абсолютному (48 кл/1 μ L (35; 62) против 40 кл/1 μ L (33; 50) при $p = 0,097$) между сравниваемыми группами отмечено не было (рис. 1).

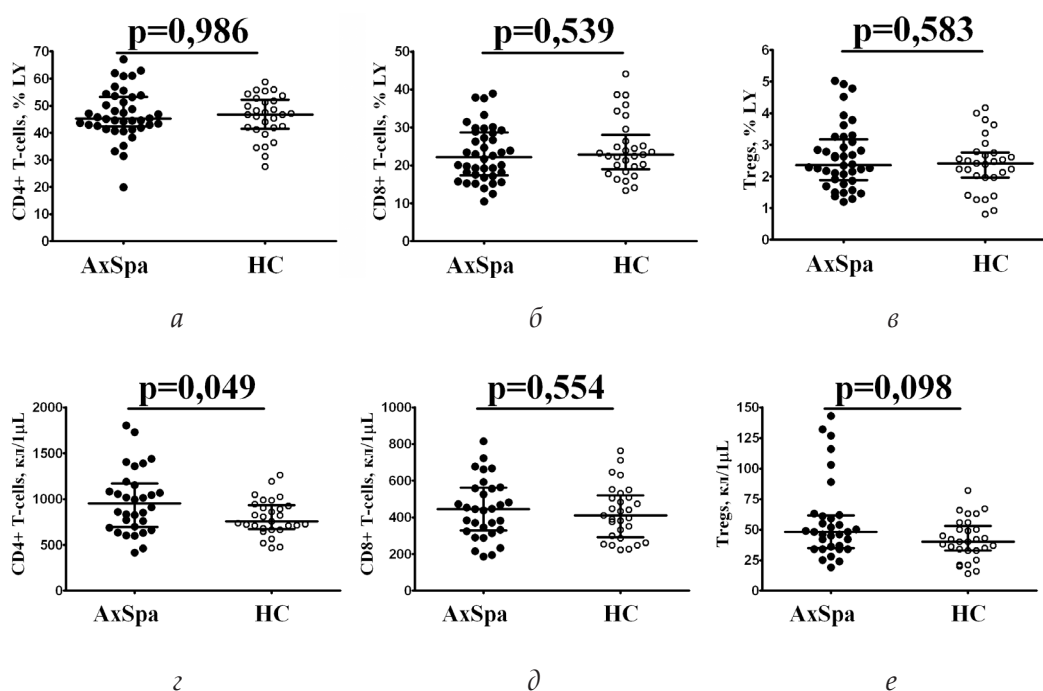


Рис. 1. Относительное и абсолютное содержание основных субпопуляций Т-хелперов, находящихся на различных стадиях дифференцировки, в периферической крови больных AxSpA ($n = 41$) и группы контроля ($n = 29$):

$a - в$ — относительное содержание, % от общего пула лимфоцитов;

$г - е$ — абсолютное содержание, количество клеток в 1 мкл цельной крови.

Слева направо — Т-хелперы (CD4 + Т-клетки) с фенотипом CD3 + CD4 +, CD8 + Т-лимфоциты с фенотипом CD3 + CD8 +, а также регуляторные Т-клетки (Tregs) с фенотипом CD3 + CD4 + CD25bright

Примечание (здесь и далее на рис. 2, 3): черные круги — пациенты с AxSpA; белые круги — группа условно здоровых доноров. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Med (Q25; Q75)). Достоверность различий указана согласно U-критерию Манна — Уитни.

Fig. 1. The relative and absolute frequencies of main maturation CD4 + T-cells subsets in peripheral blood samples from patients with AxSpA ($n = 41$) and healthy individuals ($n = 29$):

$a - в$ — the relative frequency, % within total lymphocytes;

$г - е$ — the absolute frequency, the number of cells per 1 μ L of whole blood.

From left to right — Th cells (CD4 + T cells), CD8 + T cells (CD3 + CD4 +), regulatory T-cells (Tregs, CD3 + CD4 + CD25 bright)

Note (here and on Fig. 2 and Fig. 3): black circles denote patients with AxSpA; white circles — healthy individuals. Each dot represents individual subjects, and horizontal bars depict the group medians and quartile ranges (Med (Q25; Q75)). The statistical analysis was performed with the Mann—Whitney U test.

В ходе дальнейших исследований общий пул Tregs был разделен на три основные популяции на основании анализа коэкспрессии CD45RA и CD62L. Были выявлены популяции «наивных» Tregs (CD62L + CD45RA +), а также Tregs центральной (CD62L + CD45RA –) и эффекторной (CD62L – CD45RA –) памяти, как это было предложено ранее [15]. Было показано (рис. 2), что у пациентов с AxSpA снижается относительное содержание «наивных» Tregs (19,16 % (11,92; 26,70) против 26,70 % (20,54; 33,03) при $p = 0,006$), тогда как уровни Tregs центральной (78,29 % (69,95; 84,17) против 69,73 % (64,01; 77,37) при $p = 0,023$) и эффекторной (3,26 % (1,90; 4,50) против 1,79 % (1,08; 2,36) при $p = 0,005$) памяти были повышены относительно значений контроля. Более того, при анализе абсолютного содержания указанных субпопуляций Tregs нами также было отмечено, что концентрации Tregs центральной (78 кл/1 μ L (70; 84) против 70 кл/1 μ L (64; 77) при $p = 0,006$) и эффекторной (3 кл/1 μ L (2; 4) против 2 кл/1 μ L (1; 2) при $p = 0,001$) памяти у пациентов с AxSpA были повышены.

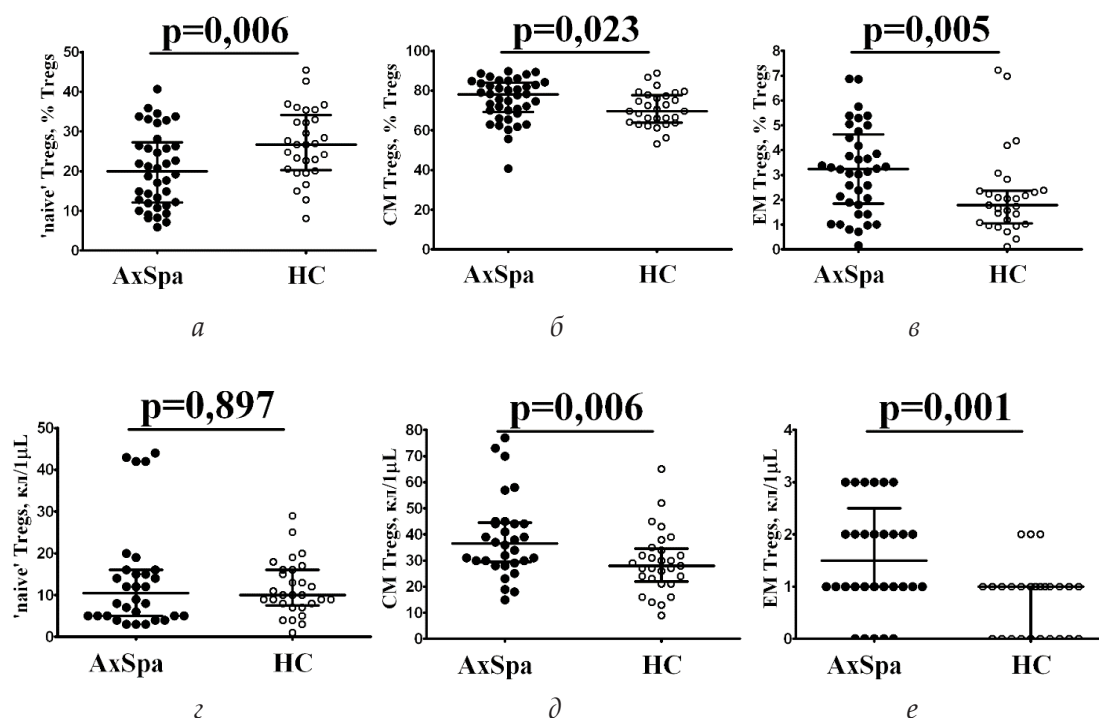


Рис. 2. Относительное и абсолютное содержание основных субпопуляций регуляторных Т-клеток, находящихся на различных стадиях дифференцировки, в периферической крови больных AxSpA ($n = 32$) и группы контроля ($n = 29$):
 а–в — относительное содержание, % от общего пула Treg; г–е — абсолютное содержание, количество клеток в 1 мкл цельной крови. Слева направо — содержание «наивных» Treg с фенотипом CD45RA + CD62L + (naïve), содержание Treg центральной памяти с фенотипом CD45RA – CD62L + (CM) и содержание Treg эффекторной памяти с фенотипом CD45RA – CD62L – (EM)

Fig. 2. The relative and absolute frequencies of main maturation regulatory T-cell subsets in peripheral blood samples from patients with AxSpA ($n = 32$) and healthy individuals ($n = 29$):

а–в — the relative frequency, % within total Treg subsets;

г–е — the absolute frequency, the number of cells per 1 μ L of whole blood.

From left to right — the frequencies of 'naïve' Tregs ('naïve', CD45RA + CD62L +), central memory Tregs (CM, CD45RA – CD62L +) and effector memory Tregs (EM, CD45RA – CD62L –)

В ходе дальнейших исследований на основании анализа экспрессии хемокиновых рецепторов общий пул Tregs был разделен на отдельные субпопуляции, в том числе CXCR5+ фолликулярные регуляторные Т-клетки (Tfr), а также 4 подтипа CXCR5 – Tregs, включая Tr1 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –, Tr2 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –, Tr17 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + и Tr17.1 клетки с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +. Было показано (рис. 3), что в периферической крови больных AxSpA повышалось как относительное (23,85 % (19,44; 26,12) против 17,94 % (13,53; 22,35) при $p = 0,005$), так и абсолютное (17 кл/1 μ L (9; 23) против 7 кл/1 μ L (5; 9) при $p < 0,001$) содержание CXCR3-экспрессирующий Tregs относительно значений здорового контроля. Более того, статистический анализ показал прирост концентраций остальных субпопуляций Tregs, включая Tr2, Tr17, Tr17.1 и Tfr в циркуляции у пациентов с AxSpA (21 кл/1 μ L (14; 32) против 13 кл/1 μ L (11; 20) при $p = 0,013$; 14 кл/1 μ L (8; 21) против 9 кл/1 μ L (6; 12) при $p = 0,013$; 6 кл/1 μ L (4; 12) против 5 м (3; 6) при $p = 0,044$; и 4 кл/1 μ L (3; 6) против 3 (1; 4) при $p = 0,027$ соответственно).

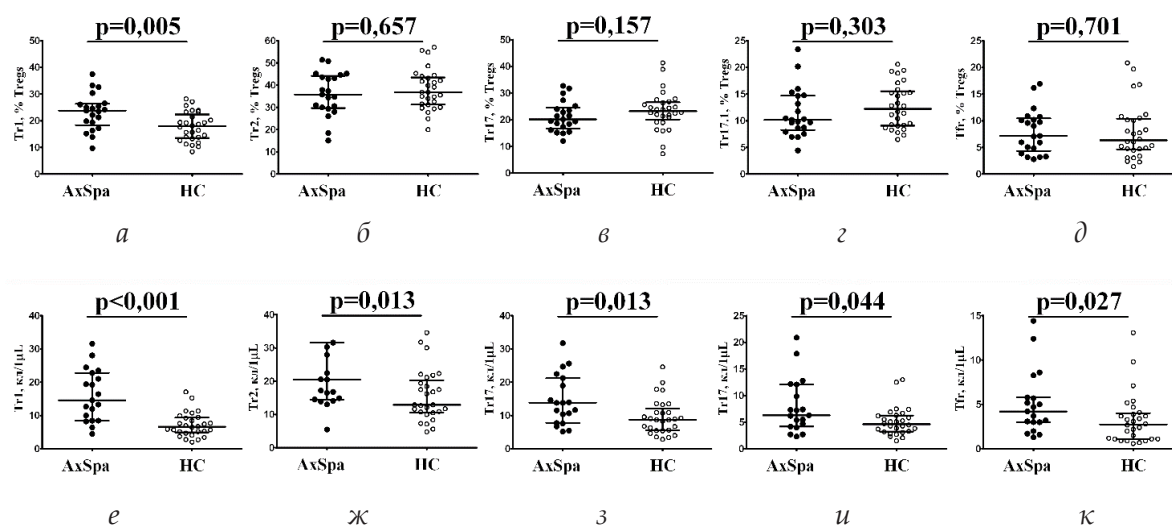


Рис. 3. Относительное и абсолютное содержание основных субпопуляций регуляторных Т-клеток, выявленных на основании экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR5, CXCR3 и CCR6, в периферической крови больных AxSpA (n = 21) и группы контроля (n = 28):

a—д — относительное содержание, % от общего пула Treg;

e—к — абсолютное содержание, количество клеток в 1 мкл цельной крови.

Слева направо — содержание Tr1 клеток с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –, Tr2 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –, Tr17 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + и Tr17.1 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +, а также Tfr с фенотипом CXCR5 +

Fig. 3. The relative and absolute frequencies of main 'polarized' regulatory T-cell subsets in peripheral blood samples from patients with AxSpA (n = 32) and healthy individuals (n = 29):

a—d — the relative frequency, % within total Treg subsets;

e—к — the absolute frequency, the number of cells per 1 μ L of whole blood.

From left to right — the frequencies of Tr1 (CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –),

Tr2 (CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –), Tr17 (CXCR5 – CXCR3 – CCR6 +),

Tr17.1 (CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +), and follicular regulatory T cells (Tfr, CXCR5 +)

На финальном этапе наших исследований был проведен анализ распределения Tr1 клеток с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –, Tr2 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –, Tr17 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 – CCR6 + и Tr17.1 с фенотипом CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +, а также Tfr с фенотипом CXCR5 + в рам-

ках общего пула СМ Treg, «патрулирующих» периферические лимфоидные органы, и ЕМ Treg, способных покидать кровоток и мигрировать в периферические воспаленные ткани (табл. 2). Было показано, что относительное содержание Tr1 клеток достоверно повышено у пациентов с AxSpA исключительно в рамках пула СМ клеток, тогда как доля Tr2 клеток при AxSpA достоверно возрастала в рамках обеих субпопуляций Tregs. Также отмечалось, что Tr17 были снижены у пациентов с AxSpA как среди СМ, так и среди ЕМ Treg клеток. Более того, доля CXCR3 + CCR6 + Tr17.1 снижалась только при анализе Tregs центральной памяти.

Таблица 2

Изменения в субпопуляционном составе регуляторных Т-клеток центральной и эффекторной памяти в периферической крови больных анкилозирующим спондилоартритом

Table 2

Alterations in peripheral blood circulating central and effector memory Tregs subsets in patients with axial spondyloarthritis

Клетки	Фенотип субпопуляций Treg	AxSpa (n = 21) Med (Q25; Q75)	HC (n = 28) Med (Q25; Q75)	p
<i>Относительное содержания в рамках СМ Treg</i>				
Tr1	CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –	24,42 (20,16; 28,07)	16,54 (12,34; 22,40)	0,008
Tr2	CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –	23,65 (16,50; 31,14)	17,37 (12,61; 21,20)	0,008
Tr17	CXCR5 – CXCR3 – CCR6 +	25,08 (21,65; 30,85)	33,99 (27,25; 39,08)	0,003
Tr17.1	CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +	15,53 (11,65; 19,72)	20,42 (16,86; 23,70)	0,003
Tfr	CXCR5 +	7,83 (6,88; 13,81)	9,37 (5,39; 14,04)	0,952
<i>Относительное содержания в рамках ЕМ Treg</i>				
Tr1	CXCR5 – CXCR3 + CCR6 –	12,40 (7,69; 19,87)	7,92 (4,09; 12,55)	0,066
Tr2	CXCR5 – CXCR3 – CCR6 –	20,83 (16,67; 32,90)	14,16 (10,24; 19,12)	0,017
Tr17	CXCR5 – CXCR3 – CCR6 +	44,44 (31,58; 52,94)	50,05 (43,69; 62,99)	0,029
Tr17.1	CXCR5 – CXCR3 + CCR6 +	13,96 (9,72; 19,77)	16,33 (11,25; 26,27)	0,214
Tfr	CXCR5 +	5,56 (2,50; 7,69)	4,00 (1,24; 6,42)	0,341

Обсуждение

В рамках проведенного исследования нами были выявлены нарушения в субпопуляционном составе регуляторных Т-клеток у пациентов с аксиальным спондилоартритом. Эти нарушения были связаны не только с созреванием и дифференцировкой Treg клеток, но и с их распределением по различным стадиям «поляризации», что может быть связано с патогенезом данного заболевания.

Следует отметить, что данные литературы по относительному и абсолютному содержанию регуляторных Т-клеток (Treg) в периферической крови больных весьма противоречивы. Так, в некоторых работах было показано, что уровни Treg в циркуляции у больных и группы сравнения достоверно не различались [8; 16; 17], что было подтверждено нами в ходе проведенного исследования. Однако некоторые группы исследователей указывают на достоверное снижение как CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg [18], так и CD4 + CD25^{high}CD127^{low} – Treg [19] в периферической крови больных анкилозирующим спондилитом. Было показано, что содержание Treg отрицательно коррелирует с тяжестью заболевания,

выраженной в баллах индекса BASDAI [20]. С другой стороны, уровень Treg в циркуляции был тесно связан с увеличением таких маркеров воспаления, как скорость оседания эритроцитов и С-реактивный белок [21].

Кроме того, анализ ключевых стадий дифференцировки Treg показал, что в периферической крови пациентов с AxSpA снижался уровень «наивных» или «тимических» Treg, тогда как доля эффекторных популяций Tregs возрастала. Сходные результаты были получены Ye и соавт., показавшими снижение уровня «наивных» Treg с фенотипом CD4+FOXP3lowCD45RO–, однако полученные авторами результаты также указывали на снижение эффекторных Treg с фенотипом CD4+FOXP3highCD45RO+ [22]. Кроме того, при анализе общего пула CD4+ Т-клеток было отмечено, что при AxSpA уровни «наивных» Th и Th центрально памяти снижались, причем была отмечена прямая зависимость между содержанием «наивных» Th и концентраций СРБ в сыворотке крови [23]. С одной стороны, как собственные результаты, так и данные литературы указывают на снижение эффективности формирования «наивных», или «тимических», Treg в тимусе. Следует отметить тот факт, что именно «тимические» Treg, способные распознавать собственные антигены организма, считаются самыми эффективными клетками с точки зрения блокады аутоиммунных реакций, а нарушение их функций может быть тесно связано с низкой эффективностью блокады аутореактивности [24]. С другой стороны, выявленное нами снижение уровня «наивных» Treg может быть связано с перераспределением субпопуляций этих клеток в сторону более высоко дифференцированных типов Treg, включая клетки центральной и эффекторной памяти, концентрация которых в периферической крови пациентов с AxSpA возрастала. По-видимому, это могло быть связано не только с нарушением дифференцировки Tregs в тимусе, сколько с увеличением формирования этого типа клеток в периферических лимфоидных органах в ходе антиген-зависимой дифференцировки клеток, на что также указывает увеличение концентраций именно СМ и ЕМ Treg.

Также нами было отмечено увеличение уровня CXCR3-позитивных Th1-like Treg у пациентов с AxSp A. В настоящее время известно, что для Th1-like Treg характерно наличие фактора транскрипции T-bet, наличие CXCR3 на мембране и продукция IFN-γ, тогда как Th2-like Treg характеризуются наличием GATA3 и способностью к продукции Th2-цитокинов, включая IL-4, IL-5 и IL-13, и, наконец, Th17-like Treg-клетки описываются как IL-17A-секретирующие RORγt-позитивные лимфоциты, несущие еще и CCR6 на своей мембране [25; 26]. Более того, при фенотипической характеристике CXCR3+ Th1-like Treg было показано, что данная популяция клеток экспрессировала FoxP3, CTLA-4 и Helios на уровнях, достоверно не отличимых от таковых других субпопуляций Tregs, включая CXCR3–CCR6+CCR4+CCR10+ Th22-like Tregs, CXCR3–CCR6+CCR4+CCR10–Th17-like Treg, а также CCR6–CXCR3–CCR4+ Th2-like Tregs [13]. Однако в ответ на стимуляцию *in vitro* именно Th1-like Treg продуцировали максимальное количество IL-10 по сравнению с другими типами Treg, а также IFNγ. И наконец, в CXCR3+ Th1-like Treg обнаруживалась экспрессия транскрипционного фактора T-bet (TBX21), свойственного Th1-like-клеткам различных субпопуляций. Также было показано, что CXCR3+ Th1-like Treg экспрессировали повышенные уровни CD73 и TGF-β1 по сравнению с другими субпопуляциями Tregs [27]. Все это позволяет рассматривать CXCR3+ Th1-like Treg в качестве одних из самых эффективных супрессоров среди различных субпопуляций Treg-клеток организма человека, которые играют важную роль в патогенезе широкого спектра аутоиммунных заболеваний [28]

С использованием экспериментальных моделей *in vivo* было показано, что CXCR3+ Treg были способны по градиенту лигандов CXCR3 — CXCL9, CXCL10 и CXCL11 — мигрировать в очаги воспаления, где они эффективно подавляли эффекторные реакции, опосредованные Th1-клетками и их клетками-мишенями

ми [29; 30]. Следует также отметить, что в сыворотке крови больных АхSpA отмечен высокий уровень хемокина CXCL9 — одного из трех описанных лигандов для CXCR3, который рассматривается в качестве одного из ключевых маркеров Th1-лимфоцитов [31]. Также было показано, что у первично выявленных пациентов с АхSpA концентрация CXCL10 в крови повышалась и коррелировала с СОЭ, СРБ и ASDAS, тогда как на фоне терапии уровень этого хемокина снижался [32]. Данные литературы указывают на значительное увеличение Th1-клеток у пациентов с умеренной и высокой активностью АС по сравнению с группой контроля [16]. Более того, в рамках другого исследования было показано, что в периферической крови больных АхSpA увеличивался уровень Th1-клеток с фенотипом CD4 + CXCR3 + по сравнению с группой условно здоровых добровольцев [33].

Помимо CXCR3 + Th1-клеток потенциальной мишенью для Th1-лимфоцитов могут служить сравнительно недавно описанная в литературе популяция «неклассических» Th17 — Th1/Th17 или Th17.1, обладающая характеристиками как Th1-, так и Th17-лимфоцитов, включая экспрессию факторов транскрипции T-BET, STAT4 и RORC, экспрессию хемокиновых рецепторов CCR6 и CXCR3, а также способностью к синтезу IFN- γ , IL-17A и GM-CSF [34]. Эти свойства, особенно способность к синтезу цитокинов, которые как могут активировать тканевые макрофаги за счет IFN- γ , так и привлекать нейтрофилы в очаг воспаления за счет продукции IL-17A и GM-CSF, а также высокий уровень экспрессии транспортера MDR1, отвечающего за устойчивость клеток в различного рода препаратам, включая глюкокортикоиды, позволили рассматривать данную популяцию CXCR3 + Th17-клеток в качестве «патогенной», то есть способствующей развитию и поддержанию воспалительной реакции в тканях. Так, относительное содержание IL-17-позитивных Th у больных АС было выше значений группы сравнения [35]. Причем почти все IL-17 + Th-клетки обладали фенотипом клеток памяти CD4 + CD45RO +, а также значительная часть Th-клеток, продуцирующих IL-17, также синтезировала IL-22 и IFN γ , что позволяет рассматривать их в качестве «классических» Th17 (Th17/22) и Th17.1. В рамках другого исследования было показано, что для больных АС были характерны повышенные уровни CCR6 + -клеток на фоне сниженного содержания CXCR3 + -лимфоцитов среди активированных (CD25int) CD3 + CD4 + -клеток периферической крови [36]. Более того, экспрессия CXCR3 была также снижена на CD4 + Т-клетках памяти больных по сравнению с группой контроля. Возможно, выявленное повышение уровня CXCR3 + Treg зрелых популяций может рассматриваться в качестве компенсаторного механизма, направленного на подавление аутоиммунного ответа, опосредованного Th1- и/или Th17-клетками, в очагах воспаления, локализованных в периферических тканях.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2022-301, 20.04.2022).

Conflict of interest. The authors declare absence of the conflict of interest.

Список литературы

1. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R., Listing J., Akkoc N., Brandt J., et al. SpondyloArthritis international Society (ASAS) Classification Criteria for Axial Spondyloarthritis (Part II): Validation and Final Selection. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, 6, 777–783, DOI: 10.1136/ard.2009.108233.
2. El Maghraoui A. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur. J. Intern. Med.* 2011, 22, 6, 554–560, DOI: 10.1016/j.ejim.2011.06.006.
3. Kuiper J. J., Prinz J. C., Stratikos E., Kuśnierczyk P., Arakawa A., Springer S., et al. EULAR studygroup MHC-I-opathies. EULAR study group on 'MHC-I-opathy': identifying disease-overarching mechanisms across disciplines and borders. *Ann. Rheum. Dis.* 2023, 82, 7, 887–896, DOI: 10.1136/ard-2022-222852.
4. Britanova O. V., Lupyr K. R., Staroverov D. B., Shagina I. A., Aleksandrov A. A., Ustyugov Y. Y., et al. Targeted depletion of TRBV9+ T cells as immunotherapy in a patient with ankylosing spondylitis. *Nat. Med.* 2023, 29, 11, 2731–2736, DOI: 10.1038/s41591-023-02613-z.
5. Generali E., Bose T., Selmi C., Voncken J. W., Damoiseaux J. G. M. C. Nature versus nurture in the spectrum of rheumatic diseases: Classification of spondyloarthritis as autoimmune or autoinflammatory. *Autoimmun. Rev.* 2018, 17, 9, 935–941, DOI: 10.1016/j.autrev.2018.04.002.
6. Mauro D., Thomas R., Guggino G., Lories R., Brown M. A., Ciccia F. Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? *Nat. Rev. Rheumatol.* 2021, 17, 387–404, DOI: 10.1038/s41584-021-00625-y.
7. Kim S. H., Lee S. H. Updates on ankylosing spondylitis: pathogenesis and therapeutic agents. *J. Rheum. Dis.* 2023, 30, 4, 220–233, DOI: 10.4078/jrd.2023.0041.
8. Cao D., van Vollenhoven R., Klareskog L., Trollmo C., Malmström V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.* 2004, 6, 4, R335–R346, DOI: 10.1186/ar1192.
9. Liao H. T., Lin Y. F., Tsai C. Y., Chou C. T. Regulatory T cells in ankylosing spondylitis and the response after adalimumab treatment. *Joint Bone Spine.* 2015, 82, 6, 423–427, DOI: 10.1016/j.jbspin.2015.03.003.
10. Wang M., Liu C., Bond A., Yang J., Zhou X., Wang J., et al. Dysfunction of regulatory T cells in patients with ankylosing spondylitis is associated with a loss of Tim-3. *Int. Immunopharmacol.* 2018, 59, 53–60, DOI: 10.1016/j.intimp.2018.03.032.
11. Zhao Z. B., Bian Z. H., Lin Z. M., Wu S. F., Long J., Cui Y., et al. Single-Cell Analysis of Patients with Axial Spondyloarthritis After Anti-TNF α Treatment: Experimental Data and Review of the Literature. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2023, 65, 2, 136–147, DOI: 10.1007/s12016-023-08959-z.
12. Dhaeze T., Peelen E., Hombrouck A., Peeters L., Van Wijmeersch B., Lemkens N., et al. Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 2015, 195, 3, 832–840, DOI: 10.4049/jimmunol.1500759.
13. Duhén T., Duhén R., Lanzavecchia A., Sallusto F., Campbell D. J. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood.* 2012, 119, 19, 4430–4440, DOI: 10.1182/blood-2011-11-392324.
14. Kudryavtsev I., Zinchenko Y., Starshinova A., Serebriakova M., Malkova A., Akisheva T., et al. Circulating Regulatory T Cell Subsets in Patients with Sarcoidosis. *Diagnostics (Basel).* 2023, 13, 8, 1378, DOI: 10.3390/diagnostics13081378.

15. Lu S. Y., Liu K. Y., Liu D. H., Xu L. P., Huang X. J. High frequencies of CD62L⁺ naive regulatory T cells in allografts are associated with a low risk of acute graft-versus-host disease following unmanipulated allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 2011, 165, 2, 264–277, DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04418.x.
16. Wang C., Liao Q., Hu Y., Zhong D. T lymphocyte subset imbalances in patients contribute to ankylosing spondylitis. *Exp. Ther. Med.* 2015, 9, 1, 250–256, DOI: 10.3892/etm.2014.2046.
17. Ye L., Goodall J. C., Zhang L., Putintseva E. V., Lam B., Jiang L., et al. TCR usage, gene expression and function of two distinct FOXP3(+)Treg subsets within CD4(+)CD25(hi) T cells identified by expression of CD39 and CD45RO. *Immunol. Cell Biol.* 2016, 94, 3, 293–305, DOI: 10.1038/icb.2015.90.
18. Wu Y., Ren M., Yang R., Liang X., Ma Y., Tang Y., et al. Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.* 2011, 13, 1, R29, DOI: 10.1186/ar3257.
19. Zhao S. S., Hu J. W., Wang J., Lou X. J., Zhou L. L. Inverse correlation between CD4+CD25high CD127low/- regulatory T-cells and serum immunoglobulin A in patients with new-onset ankylosing spondylitis. *J. Int. Med. Res.* 2011, 39, 5, 1968–1974, DOI: 10.1177/147323001103900543.
20. Xueyi L., Lina C., Zhenbiao W., Qing H., Qiang L., Zhu P. Levels of circulating Th17 cells and regulatory T cells in ankylosing spondylitis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *J. Clin. Immunol.* 2013, 33, 1, 151–161, DOI: 10.1007/s10875-012-9774-0.
21. Liao H. T., Tsai C. Y. Cytokines and regulatory T cells in ankylosing spondylitis. *Bone Joint Res.* 2023, 12, 2, 133–137, DOI: 10.1302/2046-3758.122.BJR-2022-0195.R1.
22. Dejaco C., Duftner C., Klauser A., Schirmer M. Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatol. Int.* 2010, 30, 3, 297–303, DOI: 10.1007/s00296-009-0949-9.
23. Gui L., Luo X., Zhou L., Wei Q., Gu J. Peripheral CD4+ /CD8+ T cell composition distinct from healthy individuals is shared by ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2023, 26, 10, 2014–2023, DOI: 10.1111/1756-185X.14860.
24. Cheru N., Hafler D. A., Sumida T. S. Regulatory T cells in peripheral tissue tolerance and diseases. *Front. Immunol.* 2023, 14, 1154575, DOI: 10.3389/fimmu.2023.1154575.
25. Qiu R., Zhou L., Ma Y., Zhou L., Liang T., Shi L., Long J., Yuan D. Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2020, 58, 1, 52–70, DOI: 10.1007/s12016-018-8721-0.
26. Sjaastad L. E., Owen D. L., Tracy S. I., Farrar M. A. Phenotypic and Functional Diversity in Regulatory T Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 715901, DOI: 10.3389/fcell.2021.715901.
27. Zhang R., Miao J., Zhang K., Zhang B., Luo X., Sun H., et al. Th1-Like Treg Cells Are Increased But Deficient in Function in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 2022, 13, 863753, DOI: 10.3389/fimmu.2022.863753.
28. Rubinstein A., Kudryavtsev I., Arsentieva N., Korobova Z. R., Isakov D., Totolian A. A. CXCR3-Expressing T Cells in Infections and Autoimmunity. *Front. Biosci (Landmark Ed)*. 2024, 29, 8, 301, DOI: 10.31083/j.fbl2908301.
29. Tan T. G., Mathis D., Benoist C. Singular role for T-BET+CXCR3+ regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016, 113, 49, 14103–14108, DOI: 10.1073/pnas.1616710113.

30. Koch M. A., Tucker-Heard G., Perdue N. R., Killebrew J. R., Urdahl K. B., Campbell D. J. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 2009, 10, 6, 595–602, DOI: 10.1038/ni.1731.
31. Duftner C., Dejaco C., Kullich W., Klauser A., Goldberger C., Falkenbach A., Schirmer M. Preferential type 1 chemokine receptors and cytokine production of CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65, 5, 647–653, DOI: 10.1136/ard.2005.042085.
32. Wang J., Zhao Q., Wang G., Yang C., Xu Y., Li Y., et al. Circulating levels of Th1 and Th2 chemokines in patients with ankylosing spondylitis. *Cytokine.* 2016, 81, 10–14, DOI: 10.1016/j.cyto.2016.01.012.
33. Szalay B., Mészáros G., Cseh Á., Ács L., Deák M., Kovács L., et al. Adaptive immunity in ankylosing spondylitis: phenotype and functional alterations of T-cells before and during infliximab therapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 2012, 808724, DOI: 10.1155/2012/808724.
34. Paulissen S. M., van Hamburg J. P., Davelaar N., Vroman H., Hazes J. M., de Jong P. H., et al. CCR6(+) Th cell populations distinguish ACPA positive from ACPA negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2015, 17, 344, DOI: 10.1186/s13075-015-0800-5.
35. Shen H., Goodall J. C., Hill Gaston J. S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009, 60, 6, 1647–1656, DOI: 10.1002/art.24568.
36. Wright P. B., McEntegart A., McCarey D., McInnes I. B., Siebert S., Milling S. W. Ankylosing spondylitis patients display altered dendritic cell and T cell populations that implicate pathogenic roles for the IL-23 cytokine axis and intestinal inflammation. *Rheumatology (Oxford).* 2016, 55, 1, 120–132, DOI: 10.1093/rheumatology/kev245.

Об авторах

Илья Андреевич Артемьев, врач-ревматолог, консультативно-диагностический центр, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0002-2001-8713

Артур Даниил Акино, младший научный сотрудник Научно-исследовательская лаборатория микровезикулярного сигналинга Института молекулярной биологии и генетики, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0001-6516-7184

Ирина Ильинична Дрейзис, студент, Институт медицинского образования, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0009-0004-3673-015X

Полина Валерьевна Тирикова, студент, Институт медицинского образования, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0002-4433-1640

Римма Даниловна Дунаева, клинический ординатор, отделение ревматологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0009-0008-6016-1400

Екатерина Викторовна Центр, клинический ординатор, отделение ревматологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0009-0004-0478-6925

Артем Аркадьевич Рубинштейн, лаборант-исследователь, Научно-исследовательский отдел иммунологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0002-8493-5211

Алексей Сергеевич Головкин, доктор медицинских наук, заведующий Научно-исследовательская лаборатория микровезикулярного сигналинга института молекулярной биологии и генетики, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0002-7577-628x

Игорь Владимирович Кудрявцев, кандидат биологических наук, заведующий Научно-исследовательский отдел иммунологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия.

ORCID: 0000-0001-7204-7850

Алексей Леонидович Маслянский, доктор медицинских наук, заведующий Научно-исследовательская лаборатория ревматологии и иммунопатологии, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Россия; научный консультант, Научно-исследовательский институт ревматологии им. В. А. Насоновой, Россия; профессор, Научно-клинический и образовательный центр гастроэнтерологии и гепатологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Россия.

ORCID: 0000-0003-2427-4148

The authors

Ilya A. Artemyev, Rheumatologist, Consultative and Diagnostic Center, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0002-2001-8713

Arthur D. Aquino, Junior Researcher of Laboratory of Microvesicular Signaling, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0001-6516-7184

Irina I. Dreizis, Student, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0009-0004-3673-015X

Polina V. Tirikova, Student, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0002-4433-1640

Rimma D. Dunaeva, Clinical Resident, Department of Rheumatology, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0009-0008-6016-1400

Ekaterina V. Centr, Clinical Resident, Department of Rheumatology, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0009-0004-0478-6925

Artem A. Rubinstein, Laboratory Research Assistant, Department of Immunology, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0002-8493-5211

Alexey S. Golovkin, MD, Doctor of Medical Sciences, the Head of Laboratory of Microvesicular Signaling, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0002-7577-628x

Igor V. Kudryavtsev, PhD in Biology, the Head of Department of Immunology, Almazov National Medical Research Centre, Russia.

ORCID: 0000-0001-7204-7850

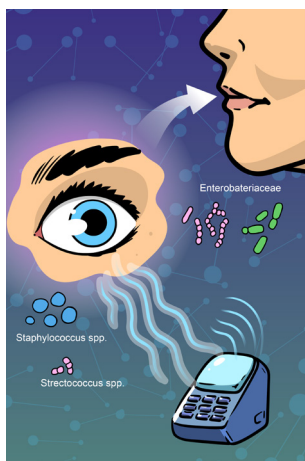
Alexey L. Maslyanskiy, MD, Doctor of Medical Sciences, the Head of Rheumatology and Immunopathology Research Laboratory, Almazov National Medical Research Centre, Russia; Scientific Consultant of V. A. Nasonova Research Institute of Rheumatology Russia; Professor of Scientific, Clinical and Educational Centre of Gastroenterology and Hepatology, Saint Petersburg State University, Russia.

ORCID: 0000-0003-2427-4148

Оригинальная исследовательская статья

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ — ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ КЕРАТИТОВ И ЯЗВ РОГОВИЦЫ

О. С. Полуян*, С. А. Костюк, М. Ю. Ревтович



Белорусский государственный
медицинский университет,
220083, Республика Беларусь, Минск

*Автор-корреспондент: olga.poluyan@mail.ru

Для цитирования:

Полуян О. С., Костюк С. А.,
Ревтович М. Ю. Молекулярно-
биологическая характеристика
бактериальных агентов — этио-
логических факторов кератитов и
язв роговицы. *Задачи биомедицины*.
2025;1(2):58—76.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-4>

Поступила
10.05.2025 г.
Прошла рецензирование
19.08.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Полуян О. С., Костюк С. А.,
Ревтович М. Ю., 2025

Резюме: Инфекционный кератит и язвы роговицы — это воспалительные заболевания ткани роговицы, вызываемые различными видами бактерий, характеризующиеся как острым, так и хроническим течением, а также проявляющиеся в виде прогрессирующего изъязвления и быстро прогрессирующей гнойной инфекции любой части ткани роговицы. Бактериальные язвы роговицы составляют одну из наиболее тяжелых патологий глаз ввиду риска перфорации роговицы и инфицирования с развитием эндофтальмита. Целью исследования было проведение молекулярно-генетических исследований по определению спектра бактериальных возбудителей в различном биологическом материале пациентов с кератитами и язвами роговицы. Выявление патогенных микроорганизмов проводилось методом ПЦР в режиме реального времени с качественным и количественным форматом детекции. Этиологически значимыми микроорганизмами при язвах роговицы являются *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species*, которые были выявлены в офтальмологическом биологическом материале пациентов с язвами собственной роговицы в $80,00 \pm 8,20\%$ и $70,00 \pm 7,56\%$ случаев соответственно и в $78,57 \pm 8,36\%$ и $64,29 \pm 7,65\%$ случаев с язвами роговичного трансплантата; при кератитах ДНК *Streptococcus species* выявлена в $57,89 \pm 7,18\%$, *Staphylococcus species* — $42,11 \pm 6,22\%$. Определены достоверно ($p < 0,05$) более высокие значения концентрации ДНК выявленных микроорганизмов (10^6 ГЭ/мл) в соскобах эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей и по сравнению с биологическим материалом из глаза (10^4 — 10^5 ГЭ/мл). Верхние дыхательные пути следует рассматривать в качестве возможного источника инфицирования глаза, что подтверждается количественными данными определения концентраций ДНК.

Ключевые слова: кератиты, язва собственной роговицы, язва роговичного трансплантата, микроорганизмы, ПЦР



Original research article

MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIAL AGENTS – ETIOLOGICAL FACTORS OF KERATITIS AND CORNEAL ULCERS

O. S. Poluyan*, S. A. Kostiuk, M. Yu. Revtovich

Educational Institution
«Belarusian State Medical University»,
220083, Minsk, Republic of Belarus

* Correspondence: * olga.poluyan@mail.ru

To cite this article:

Poluyan O. S., Kostiuk S. A.,
Revtovich M. Yu. Molecular biological
characteristics of bacterial agents –
etiological factors of keratitis and
corneal ulcers. *Advanced targets in
Biomedicine*. 2025;1(2):58–76.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-4>

Received
10.05.2025
Revised
19.08.2025
Accepted
01.09.2025
Published
08.12.2025

© Poluyan O. S., Kostiuk S. A.,
Revtovich M. Yu., 2025

Abstract: Infectious keratitis and corneal ulcers are inflammatory diseases of the corneal tissue caused by various types of bacteria, characterized by both acute and chronic course, and also manifested in the form of progressive ulceration and rapidly progressing purulent infection of any part of the corneal tissue. Bacterial corneal ulcers are one of the most severe eye pathologies due to the risk of corneal perforation and infection with the development of endophthalmitis. The aim of the study was to conduct molecular genetic studies to determine bacterial pathogens spectrum in various biological material of patients with keratitis and corneal ulcers. Pathogenic microorganisms were detected by real-time PCR with qualitative and quantitative formats. Etiologically significant microorganisms in corneal ulcers are *Streptococcus* species and *Staphylococcus* species, which were identified in the ophthalmological biological material of patients with own cornea ulcers in $80.00 \pm 8.20\%$ and $70.00 \pm 7.56\%$ of cases, respectively, and in $78.57 \pm 8.36\%$ and $64.29 \pm 7.65\%$ of cases with corneal transplant ulcers; in keratitis, *Streptococcus* species DNA was identified in $57.89 \pm 7.18\%$, *Staphylococcus* species – $42.11 \pm 6.22\%$. Significantly ($p < 0.05$) higher values of DNA concentration (106 GE/ml) were found in upper respiratory tract epithelial cells scrapings in comparison with eye biological material ($104\text{--}105 \text{ GE/ml}$). The upper respiratory tract should be considered as a possible source of eye infection, which is confirmed by quantitative data on determining DNA concentrations.

Keywords: keratitis, own cornea ulcer, corneal transplant ulcer, microorganisms, PCR

Введение

Инфекционный кератит и язвы роговицы являются ведущей причиной роговичной слепоты во всем мире. Согласно последнему отчету, опубликованному Всемирной организацией здравоохранения, количество заболевших инфекционным кератитом и язвами роговицы превысило 6 000 000 человек, число случаев монокулярной слепоты составляет 1 500 000—2 000 000 случаев в год [1]. Кроме того, исследование, проведенное в США, показало, что ежегодно на лечение инфекционного кератита тратилось около 175 млн долл., что подчеркивает его значительную экономическую нагрузку на систему здравоохранения [2].

Инфекционные язвы роговицы, как правило, характеризуются роговичными эпителиальными дефектами, воспалением в строме и потенциальной потерей стромальной ткани с последующим помутнением роговицы и образованием рубцов [3; 4]. Несмотря на интенсивное лечение, они обычно вызывают грубое рубцевание и, как следствие, ухудшение зрения.

По данным Всемирной организации здравоохранения среди 39 млн слепых людей непрозрачность роговицы была причиной в 4 % случаев [5]. Роговичная слепота — четвертая причина слепоты во всем мире после катаракты, глаукомы и возрастной макулярной дегенерации. Эпидемиология заболеваний роговицы охватывает широкий спектр инфекционных и воспалительных заболеваний глаз, которые вызывают помутнение и рубцевание роговицы, приводя к слепоте, ухудшая качество жизни пациентов и затрудняя социальную адаптацию. Глобальная оценка односторонней слепоты в мире, причиной которой является инфекционное заболевание роговицы, составляет 1,5—2,0 млн случаев в год [6]. В настоящее время язва роговицы для большинства стран — лидирующая причина роговичной слепоты [7; 8]. Анализ эпидемиологических данных по бактериальному кератиту и язвам роговицы затруднен, поскольку большинство данных приводятся под термином «роговичной слепоты», который сам по себе включает ряд травматических, инфекционных, воспалительных и наследственных заболеваний роговицы. Бактериальный кератит также часто называют «язвой роговицы». На практике эти термины не являются взаимозаменяемыми, поскольку роговица может содержать бактериальную инфекцию (например, бактериальный кератит) без потери ткани (язва), а роговица может иметь язву без бактериальной инфекции. Однако ежегодная заболеваемость язвами роговицы в 10 раз больше в развивающихся странах по сравнению с развитыми странами, а распространенность инфекционных кератитов колеблется в разных регионах мира от 6,3 до 700 случаев на 100 000 человек в год в зависимости от разных географических и климатических условий, экономических и социально-культурных факторов, таких как доступность медицинской помощи и стандарты ее оказания [9].

Диагноз инфекционного кератита и язвы роговицы устанавливается на основании клинических данных, дополненных микробиологическими исследованиями, такими как микроскопическое исследование, а также бактериологическим исследованием с последующим определением чувствительности к антибактериальным лекарственным средствам. Клинический анамнез в большинстве случаев способствует выявлению этиологического микробного агента: так, например, ношение контактных линз чаще ассоциируется с синегнойной палочкой и акантамебным кератитом [10—12], в то время как травма роговицы, скорее всего, связана с грибковой инфекцией [13]. Характерные клинические признаки, такие как язвы в форме дендритов (при герпетическом кератите), перистые границы и сателлитные поражения (при грибковом кератите), периневральные / кольцевые инфильтраты (при акантамебном кератите) [2], способствуют уточнению этиологического фактора.

Несмотря на то что инфекционные язвы также могут быть вызваны грибами, вирусами, микобактериями и простейшими, бактерии являются наиболее распространенной причиной инфекционного кератита. Они выступают причиной около 30—40 % всех язвенных поражений роговицы. Особенность течения инфекционного процесса при бактериальной язве зависит от вида возбудителя, вызвавшего заболевание, поэтому особенно актуальным становится решение проблемы детерминации этиологического агента. Далее по распространенности располагаются герпетические язвы — около 15 %. На фоне ношения контактных линз язвы роговицы развиваются в 12 % случаев, а на фоне дистрофических изменений тканей переднего отдела глаза (синдром сухого глаза, первичная или вторичная дистрофия роговицы) — в 19 %.

Стоит отметить, что ряд факторов может влиять на результаты микробиологического обследования при выявлении патогенного фактора, о чем сообщают разные исследователи, например применение антибактериальных и анестезирующих глазных капель, недостаточно качественный материал, ненадлежащая транспортировка и хранение. Несмотря на локальные и региональные различия в этиологии бактериального кератита, наиболее распространенные инфекционные агенты, по-видимому, аналогичны во всем мире, причем исследования демонстрируют более высокую долю грамположительных изолятов (47,6—88,6 %), чем грамотрицательных (11,4—49,6 %). Среди грамположительных инфекций чаще всего встречаются *Staphylococcus spp.*, в том числе *Staphylococcus epidermidis*, (16,6—45,5 %, в среднем 28,5 %), *Staphylococcus aureus* (9,0—42,6 %, в среднем 17,0 %), а также *Streptococcus spp.*, включая *Streptococcus pneumoniae*, и *Pseudomonas spp.*

Следовательно, имеется широкая вариабельность основных патогенов, участвующих в этиологии бактериального кератита и язв роговицы. Очень важно провести видовую идентификацию возбудителя с целью назначения своевременного этиотропного лечения.

Однако установление точного клинического диагноза инфекционного кератита и язв роговицы в реальных условиях часто является сложной задачей. В первую очередь это объясняется несколькими факторами, включая неразличимые клинические признаки, общие для различных видов возбудителей, микст-инфицирование, длительность проведения бактериологических исследований, а также их низкую эффективность в отношении анаэробных патогенов [2]. Ввиду наличия данных сложностей в настоящее время главенствующая роль в установлении этиологического фактора возникновения инфекционного кератита и язв роговицы отводится молекулярно-генетическим методам диагностики.

Цель исследования — определить видовой состав бактериальной флоры клинического биологического материала пациентов с кератитами и язвами роговицы с использованием молекулярно-биологического метода ПЦР в режиме реального времени для установления возможного очага первичного инфицирования.

Материалы и методы

В исследование включены 53 пациента (106 глаз) с кератитами и язвами роговицы различной этиологии (рис. 1). В группу исследования вошли 20 пациентов (40 глаз) с язвами собственной роговицы различной этиологии, 14 пациентов с язвами роговичного трансплантата (28 глаз), в группу сравнения — 19 пациентов (38 глаз) с кератитами. Среди них были 22 мужчины (41,5 %) и 31 женщина (58,5 %). Возраст варьировался от 19 до 77 лет, медиана составила 49,2 лет.



Рис. 1. Схема эксперимента

Fig. 1. Experimental design

Критериями включения в исследование были возраст старше 18 лет, наличие кератита или язвы роговицы, информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: неявка на контрольные осмотры, отказ от обследований. Контрольные осмотры назначали через 1, 3, 6, 12 месяцев после выписки из стационара. В тех случаях когда течение заболевания было торпидным или непрерывно рецидивирующим, осмотры назначали чаще, в индивидуальном режиме. Минимальный период наблюдения — 12 месяцев во всех случаях.

Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц (30 глаз) без офтальмологической патологии в возрасте от 30 до 45 лет (медиана — 42 года), 8 женщин (53,33 %), 7 мужчин (46,67 %).

Для проведения молекулярно-генетических исследований в качестве биологического материала 20 пациентов (40 образцов) с язвами собственной роговицы и 14 пациентов (28 образцов) с язвами роговичного трансплантата, включенных в исследование, а также 15 пациентов (30 образцов) группы контроля, использовали:

- внутриглазную жидкость (из правого и левого глаза отдельно);
- слезную жидкость (из правого и левого глаза отдельно);
- соскобы эпителиальных клеток из конъюнктивы (из правого и левого глаза отдельно);
- соскоб эпителиальных клеток из зева;
- соскоб эпителиальных клеток из носа.

Выделение ДНК из исследуемого биологического материала проводили с использованием набора реагентов «АртДНК Легкий» (ООО «АртБиоТех», РБ). По окончании этапа пробоподготовки проводили выявление и количественное определение ДНК энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*), стафилококков (рода *Staphylococcus species*) и стрептококков (рода *Streptococcus species*) с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Аэробы» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ); ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* с использованием набора реагентов «АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ); ДНК *Legionella pneumophila* с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Legionella pneumophila-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ); качественное определение ДНК *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis / faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* с использованием набора реагентов для обнаружения ДНК бактериальных патогенов, ассоциированных с септициемией, «СЕПТОСКРИН» (ООО «НПФ Литех», РФ); а также ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и обнаружения генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Corynebacterium diphtheriae / tox-genes-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ «SPSS версия 16» (SPSS Inc.). Все количественные данные имели непараметрическое распределение (проверку на нормальность проводили с использованием критерия Колмогорова — Смирнова) и представлены в виде значений медианы и квартилей (Me (Q25/75)). Для характеристики частоты изучаемых признаков использовали абсолютные показатели. Для решения задачи сравнения двух независимых групп количественных переменных применялся критерий Манна — Уитни с целью сравнения величин измерений признака. Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принят уровень $p < 0,05$ [14].

Результаты

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований нами были установлены микробиологические характеристики различного биологического материала пациентов из основной и контрольной групп.

1. Данные качественного состава микрофлоры

1.1. Пациенты с язвами собственной роговицы

Во внутриглазной жидкости 20 пациентов с язвами собственной роговицы ($n = 40$ образца) частота выявления микробного фактора бактериальной этиологии составила 100 %. При изучении видового состава выявленной флоры было установлено, что частота выявления условно-патогенной флоры рода *Streptococcus species* составила $80,00 \pm 8,20$ % ($n = 32$; 16 пациентов), рода *Staphylococcus species* — $70,00 \pm 7,76$ % ($n = 28$; 14 пациентов). Возбудитель *Streptococcus species*

детектировался в виде моноинфекции в $30,00 \pm 5,31$ % случаев ($n = 12$; 6 пациентов), *Staphylococcus species* — в $20,00 \pm 4,38$ % случаев ($n = 8$; 4 пациента), тогда как микст-инфицирование было характерно для $50,00 \pm 6,71$ % случаев ($n = 16$; 8 пациентов). ДНК семейства *Enterobacteriaceae* не была выявлена ни в одном образце. При проведении дальнейшей дифференциальной диагностики выявленной флоры с использованием набора реагентов «СЕПТОСКРИН» (РФ) ДНК *Streptococcus species* была верифицирована в тех же 32 образцах ($80,00 \pm 8,20$ %; 16 пациентов), а возбудителем, принадлежащим роду *Staphylococcus species*, был идентифицирован *Staphylococcus aureus* — во всех 28 образцах ($70,00 \pm 7,76$ %; 14 пациентов). Дифференциальная диагностика выявленных возбудителей рода *Staphylococcus species*: метициллин-чувствительные *Staphylococcus aureus* ($28,57 \pm 5,24$ %, $n = 8$; 4 пациента), метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($28,57 \pm 5,24$ %, $n = 8$; 4 пациента) и метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus species* ($42,86 \pm 6,35$ %, $n = 12$; 6 пациентов).

Спектр выявленных возбудителей и частота их встречаемости были полностью идентичными (совпадение 100 %) при исследовании слезной жидкости и соскобов эпителиальных клеток из конъюнктивы обследуемых пациентов с язвами собственной роговицы. При этом установлено, что у пациентов наблюдается одновременное инфицирование обоих глаз, независимо от того, язва собственной роговицы какого глаза (правого или левого) идентифицирована.

При исследовании соскобов эпителиальных клеток из зева и носа 20 пациентов с язвами собственной роговицы ДНК *Streptococcus species* была выявлена у 12 ($75,00 \pm 8,12$ %) из 16 пациентов, у которых в исследуемом биологическом материале из глаз (внутриглазная жидкость, слезная жидкость и соскоб эпителиальных клеток из конъюнктивы) был обнаружен данный возбудитель; ДНК *Staphylococcus species* — у 10 ($71,43 \pm 8,02$ %) из 14 пациентов; ДНК семейства *Enterobacteriaceae* выявлена не была.

Во всех образцах исследуемого биологического материала пациентов с язвами собственной роговицы ДНК *Legionella pneumophila*, а также ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, выявлена не была.

1.2. Пациенты с язвами роговичного трансплантата

Во внутриглазной жидкости 14 пациентов с язвами роговичного трансплантата ($n = 28$ образцов) частота выявления микробного фактора бактериальной этиологии составила 100 %. При изучении видового состава выявленной флоры было установлено, что частота выявления условно-патогенной флоры аэробной этиологии рода *Streptococcus species* составила $78,57 \pm 8,36$ % ($n = 22$; 11 пациентов), рода *Staphylococcus species* — $64,29 \pm 7,65$ % ($n = 18$; 9 пациентов), семейства *Enterobacteriaceae* — $28,57 \pm 5,24$ % ($n = 8$; 4 пациента). На основании изучения полученных данных было установлено, что только возбудитель *Streptococcus species* детектировался в виде моноинфекции в $28,57 \pm 5,24$ % случаев ($n = 8$; 4 пациента), тогда как микст-инфицирование *Streptococcus species* + *Staphylococcus species* было характерно для $42,86 \pm 6,35$ % случаев ($n = 12$; 6 пациентов), *Staphylococcus species* + *Enterobacteriaceae* — для $21,43 \pm 4,56$ % случаев ($n = 6$; 3 пациента), *Streptococcus species* + *Enterobacteriaceae* — для $7,14 \pm 2,66$ % случаев ($n = 2$; 1 пациент). При проведении дальнейшей дифференциальной диагностики выявленной флоры с использованием набора реагентов «СЕПТОСКРИН» (РФ) ДНК *Streptococcus species* была верифицирована в тех же 22 образцах ($78,57 \pm 8,36$ %; 11 пациентов); возбудителем, принадлежащим роду *Staphylococcus species*, был идентифицирован *Staphylococcus aureus* — во всех 18 образцах ($64,29 \pm 7,65$ %; 9 пациентов); возбудителем, принадлежащим семейству *Enterobacteriaceae* — *E. coli*, — во всех 8 образцах ($28,57 \pm 5,24$ %; 4 пациента). Дифференциальная диагностика вы-

явленных возбудителей рода *Staphylococcus species*: метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($33,33 \pm 5,69 \%$, $n = 6$; 3 пациента), которые были выявлены в ассоциации со *Enterobacteriaceae*, и метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus species* ($66,67 \pm 7,92 \%$, $n = 12$; 6 пациентов), выявленные в ассоциации со *Streptococcus species*.

Спектр выявленных возбудителей и частота их встречаемости были полностью идентичными (совпадение 100 %) при исследовании слезной жидкости и соскобов эпителиальных клеток из конъюнктивы обследуемых пациентов с язвами роговичного трансплантата. При этом установлено, что у пациентов наблюдается одновременное инфицирование обоих глаз, независимо от того, язва роговичного трансплантата какого глаза (правого или левого) идентифицирована.

При исследовании соскобов эпителиальных клеток из зева и носа 14 пациентов с язвами роговичного трансплантата ДНК *Streptococcus species* была выявлена у 10 ($90,91 \pm 9,05 \%$) из 11 пациентов, у которых в исследуемом биологическом материале из глаз (внутриглазная жидкость, слезная жидкость и соскоб эпителиальных клеток из конъюнктивы) был обнаружен данный возбудитель; ДНК *Staphylococcus species* — у 7 ($77,78 \pm 8,50 \%$) из 9 пациентов; ДНК семейства *Enterobacteriaceae* — у всех (100 %) пациентов.

Во всех образцах исследуемого биологического материала пациентов с язвами роговичного трансплантата ДНК *Legionella pneumophila*, а также ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, выявлена не была.

1.3. Пациенты с кератитами

Во внутриглазной жидкости 19 пациентов с кератитами ($n = 38$ образцов) частота выявления микробного фактора бактериальной этиологии составила 100 %. При изучении видового состава выявленной флоры было установлено, что частота выявления условно-патогенной флоры аэробной этиологии рода *Streptococcus species* составила $57,89 \pm 7,18 \%$ ($n = 22$; 11 пациентов), рода *Staphylococcus species* — $42,11 \pm 6,22 \%$ ($n = 16$; 8 пациентов). При этом во всех образцах указанные возбудители присутствовали в виде моноинфекции. ДНК семейства *Enterobacteriaceae* не была выявлена ни в одном образце. При проведении дальнейшей дифференциальной диагностики выявленной флоры с использованием набора реагентов «СЕПТОСКРИН» (РФ) ДНК *Streptococcus species* была верифицирована в тех же 22 образцах (100 %; 11 пациентов), ДНК *Staphylococcus aureus* — в 14 образцах ($87,50 \pm 9,02 \%$; 7 пациентов). Дифференциальная диагностика выявленных возбудителей рода *Staphylococcus species*: метициллин-чувствительные *Staphylococcus aureus* ($57,14 \pm 7,41 \%$, $n = 8$; 4 пациента) и метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($42,86 \pm 6,45 \%$, $n = 6$; 3 пациента).

Полностью идентичные данные (совпадение 100 %) получены при исследовании слезной жидкости и соскобов эпителиальных клеток из конъюнктивы обследуемых пациентов с кератитами. При этом установлено, что у пациентов наблюдается одновременное инфицирование обоих глаз, независимо от того, кератит какого глаза (правого или левого) идентифицирован.

При исследовании соскобов эпителиальных клеток из зева и носа 19 пациентов с кератитами ДНК *Streptococcus species* была выявлена у 8 ($72,73 \pm 8,18 \%$) из 11 пациентов, у которых в исследуемом биологическом материале из глаз (внутриглазная жидкость, слезная жидкость и соскоб эпителиальных клеток из конъюнктивы) был обнаружен данный возбудитель; ДНК *Staphylococcus species* — у 5 ($62,50 \pm 7,71 \%$) из 8 пациентов; ДНК семейства *Enterobacteriaceae* выявлена не была.

Во всех образцах исследуемого биологического материала пациентов с кератитами ДНК *Legionella pneumophila*, а также ДНК *Corynebacterium diphtheriae* и генов, кодирующих токсины *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans*, выявлена не была.

1.4. Пациенты контрольной группы

На основании проведенных молекулярно-генетических исследований как с качественным (наличие / отсутствие ДНК возбудителей), так и с количественным (определение концентраций ДНК возбудителей) форматом интерпретации полученных результатов нами было установлено отсутствие ДНК всех исследуемых возбудителей во всех видах тестируемого биологического материала пациентов контрольной группы практически здоровых лиц без офтальмологической патологии.

2. Результаты определения концентраций ДНК выявленных возбудителей

На следующем этапе нами были проведены молекулярно-генетические исследования по определению количественных уровней (концентраций) ДНК рода *Streptococcus species*, рода *Staphylococcus species*, а также семейства *Enterobacteriaceae* во всех образцах биологического материала пациентов с язвами роговицы и кератитами, в которых при проведении качественных исследований детектировалась ДНК указанных возбудителей.

Исследования проводились с использованием набора реагентов «АмплиПрайм® Флороценоз-Аэробы» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ), аналитическая чувствительность (предел обнаружения) которого составляет $2,0 \times 10^4$ ГЭ/мл. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме реального времени RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали по четырем каналам. Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции S-образной (сигмообразной) формы с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяло наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла (Ct) в соответствующей графе таблицы результатов.

На основании полученных значений порогового цикла Ct и исходя из заданных значений концентраций для ДНК-калибраторов K1 и K2 происходило автоматическое построение калибровочной прямой и расчет числа копий ДНК-мишеней для исследуемых и контрольных образцов.

Полученные значения использовали для расчета количества геномных эквивалентов ДНК соответствующих микроорганизмов, содержащихся в 1 мл исходного образца биологического материала.

Полученные при расчете значения концентраций ДНК возбудителей отражали общее содержание данных микроорганизмов в исследуемом биологическом материале, помещенном в транспортную среду.

2.1. Количественные значения ДНК *Streptococcus species* в различном биологическом материале пациентов основной группы

На основании проведенных исследований установлено, что концентрации ДНК рода *Streptococcus species*, детектируемые в различном биологическом материале пациентов основной группы, варьировались в зависимости от нозологической формы заболевания (рис. 2).

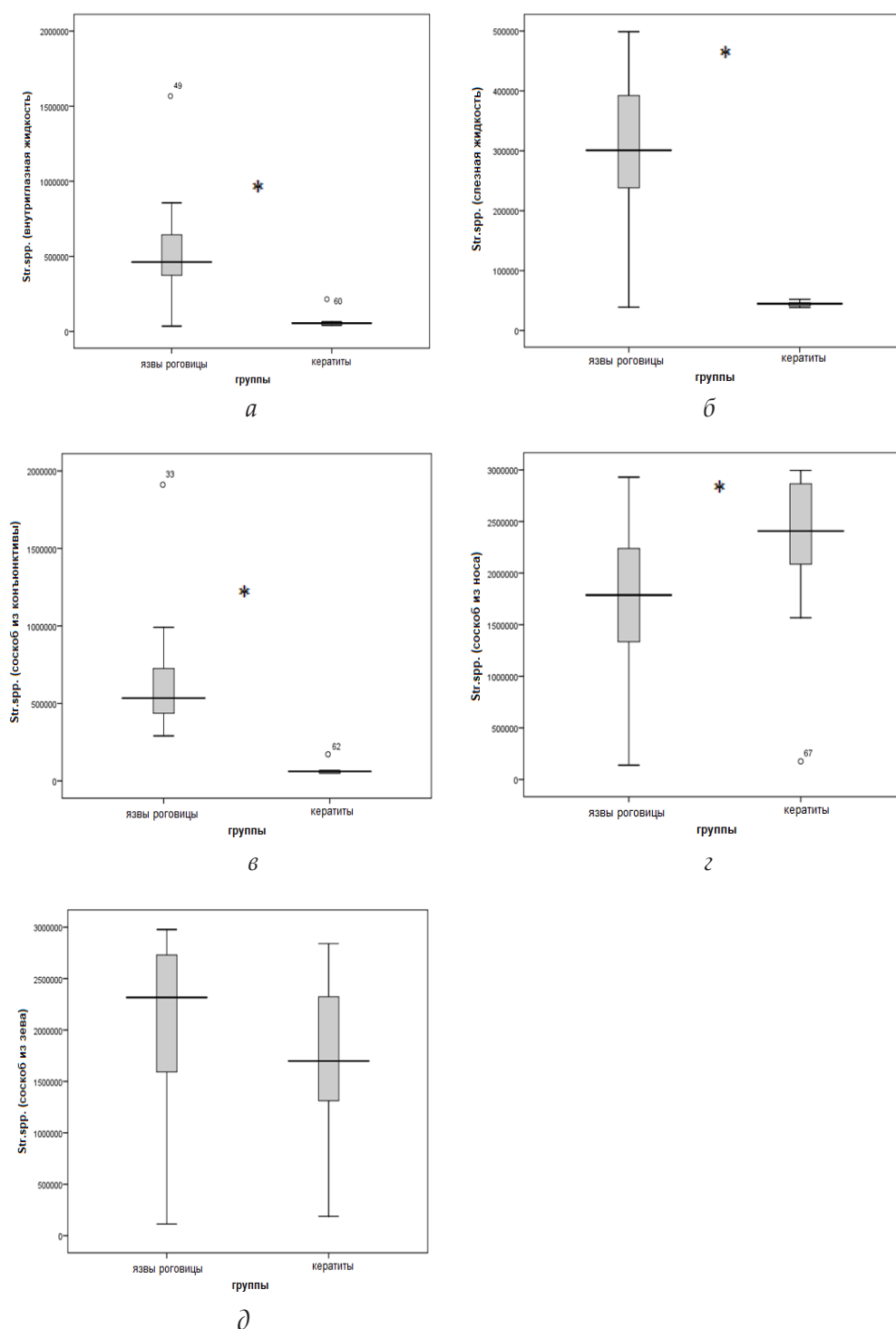


Рис. 2. Значения концентраций ДНК *Streptococcus species*:
a — во внутриглазной жидкости ($p < 0,05$); *б* — в слезной жидкости ($p < 0,05$);
в — в соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы ($p < 0,05$);
з — в соскобах эпителиальных клеток из носа ($p < 0,05$); *д* — в соскобах эпителиальных клеток из зева пациентов с язвами роговицы и кератитами

Fig. 2. *Streptococcus species* DNA concentrations values:
a — in intraocular fluid ($p < 0.05$); *б* — in tear fluid ($p < 0.05$); *в* — in conjunctiva epithelial cells scrapings ($p < 0.05$); *з* — in nose epithelial cells scrapings ($p < 0.05$);
д — in throat epithelial cells scrapings of patients with corneal ulcers and keratitis

2.2. Количественные значения ДНК *Staphylococcus species* в различном биологическом материале пациентов основной группы

На основании проведенных исследований установлено, что концентрации ДНК рода *Staphylococcus species*, детектируемые в различном биологическом материале пациентов основной группы, варьировались в зависимости от нозологической формы заболевания (рис. 3).

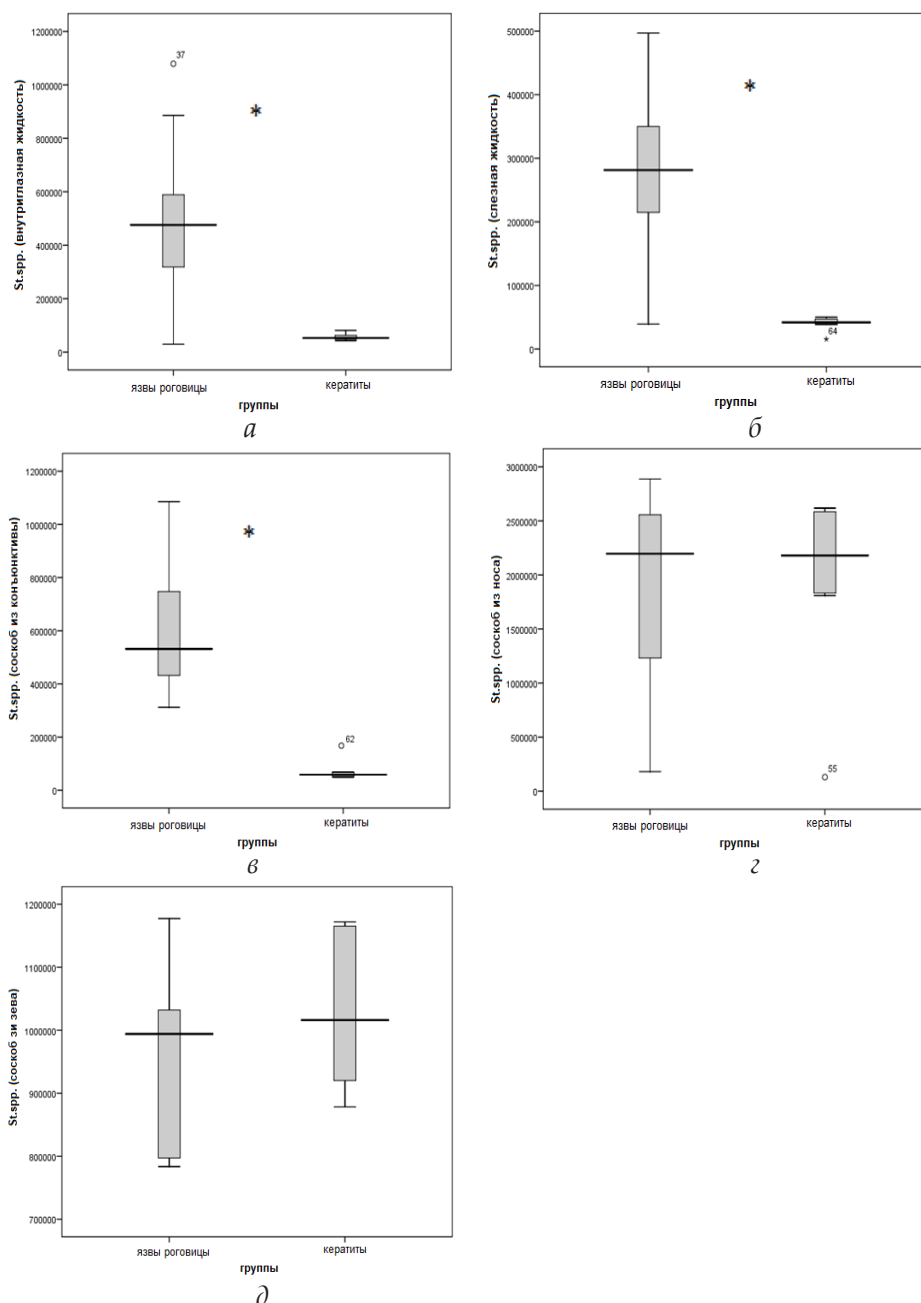


Рис. 3. Значения концентраций ДНК *Staphylococcus species*:
 а — во внутриглазной жидкости ($p < 0,05$); б — в слезной жидкости ($p < 0,05$);
 в — в соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы ($p < 0,05$);
 з — в соскобах эпителиальных клеток из носа; д — в соскобах эпителиальных клеток из зева пациентов с язвами роговицы и кератитами

Fig. 3. *Staphylococcus species* DNA concentrations values:
 а — in intraocular fluid ($p < 0.05$); б — in tear fluid ($p < 0.05$); в — in conjunctiva epithelial cells scrapings ($p < 0.05$); з — in nose epithelial cells scrapings; д — in throat epithelial cells scrapings of patients with corneal ulcers and keratitis

Обсуждение

Инфекционные кератиты и язвы роговицы представляют собой тяжелые воспалительные заболевания, которые характеризуются присутствием воспалительного очага в роговице, морфологические признаки последнего значительно варьируются в зависимости от степени тяжести и этиологии процесса: от эпителиального дефекта и наличия поверхностных инфильтратов небольших размеров, патогномоничных для аденовирусного поражения, до молниеносной деструкции стромы роговицы, сопровождающейся развитием тяжелых осложнений и возникновением перфорации, которые наблюдаются при поражении *Pseudomonas aeruginosa* [4; 15–17].

Ключевое значение на ранних этапах лечения данной патологии имеет тщательный сбор анамнеза, который позволяет выявить возможные причины и факторы риска, а также оценка степени поражения роговицы, наличия осложнений, что помогает выбрать оптимальный вариант лечения до получения результатов этиологической диагностики.

При первичном обследовании пациента с кератитом и язвой роговицы необходимо оценить степень тяжести заболевания, выявить имеющиеся осложнения и вероятные факторы риска их последующего развития, опираясь на следующие критерии: размер и локализация инфильтративного очага или области деструкции стромы роговицы (язвы), глубина очага, наличие десцеметоцеле или перфорации, степень выраженности воспаления в передней камере глаза [15]. Важным аспектом также является продолжительность эпизода заболевания. К острым кератитам относят заболевания, продолжительность которых не превышает 14 дней. При увеличении этого срока следует принимать во внимание высокую вероятность повторного инфицирования или микст-инфекцию. Оба варианта предполагают повторное проведение этиологической диагностики и последующее решение вопроса о коррекции антибактериального лечения. Чем длительнее эпизод заболевания, тем выше риск выявления высокорезистентной микрофлоры и развития неблагоприятного исхода [4; 15].

Ведущими микроорганизмами, вызывающими кератиты и язвы роговицы, являются бактерии, они обнаруживаются в 54–94 % случаев. При этом 78–83,8 % из выявленных бактерий грамположительные и только около 16,2–22 % относятся к грамотрицательным [15; 18; 19]. Среди грамположительных возбудителей кератитов и язв роговицы наибольшее значение имеют стафилококки, в частности *Staphylococcus aureus*, и коагулазонегативные стафилококки (*Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* и др.). Частота выявления полимикробных поражений увеличивается в течение последних лет вне зависимости от климатической зоны или страны и составляет от 14 до 23 % [17–19].

Staphylococcus aureus — основной патоген человека, который может вызывать раневые инфекции, бактериемию и сепсис, связанные с высоким уровнем смертности. Бактерия является комменсалом эпителия носовой полости. Носительство этого микроорганизма выявлено у 20 % здорового населения [20; 21]. У пациентов с рецидивирующими кератитами носительство *Staphylococcus aureus* в конъюнктивальной полости обнаруживается значительно чаще, чем у здоровых добровольцев и составляет 20,6 и 3 % соответственно [21].

Более высокая, чем в общей популяции, распространенность назальной колонизации *Staphylococcus aureus* была обнаружена у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит и болезнь Шегрена [21; 22].

Необходимо отметить, что количество антибактериальных препаратов для местного применения в офтальмологии очень ограничено, а антибиотикорезистентность сводит к нулю усилия офтальмологов по лечению таких пациентов. По данным литературы, в 16,9–34,9 % *Staphylococcus aureus* является метицил-

лин-резистентным, причем в 70 % случаев выявляется устойчивость и к фторхинолоновым антибиотикам, которые являются препаратами первого выбора при кератитах и язвах роговицы [19; 23–26].

Бактериологическое исследование, несмотря на широкую доступность, имеет существенные недостатки: длительность и относительно низкую результативность. Посев флоры на чувствительность к антибиотикам дает положительный результат только в 50–66 % случаев [15; 19; 23].

Таким образом, ключевая роль в диагностике этиологических факторов возникновения инфекционных кератитов и язв роговицы в настоящее время принадлежит молекулярно-генетическим методам.

На основании проведенных молекулярно-биологических исследований нами были определены концентрации ДНК условно-патогенных микроорганизмов в различном биологическом материале пациентов с язвами роговицы и кератитами (табл. 1).

Таблица 1

Значения концентраций ДНК условно-патогенных микроорганизмов в биологическом материале пациентов с язвами роговицы и кератитами

Table 1

Values of opportunistic microorganisms' DNA concentrations in biological material of patients with corneal ulcers and keratitis

Биологический материал	Концентрация <i>Streptococcus species</i> , ГЭ/мл (Me (Q25/75))		Концентрация <i>Staphylococcus species</i> , ГЭ/мл (Me (Q25/75))	
	Язвы роговицы	Кератиты	Язвы роговицы	Кератиты
Внутриглазная жидкость	$4,62 (3,68/6,68) \times 10^5$	$5,53 (4,27/6,34) \times 10^4$	$4,76 (3,16/5,99) \times 10^5$	$5,31 (4,75/6,25) \times 10^4$
Слезная жидкость	$3,00 (2,38/3,95) \times 10^5$	$4,48 (4,14/4,67) \times 10^4$	$2,81 (2,15/3,52) \times 10^5$	$4,19 (3,94/4,72) \times 10^4$
Соскоб из конъюнктивы	$5,34 (4,38/7,29) \times 10^5$	$6,15 (5,06/6,56) \times 10^4$	$5,32 (4,24/7,57) \times 10^5$	$5,89 (5,24/6,76) \times 10^4$
Соскоб из носа	$1,77 (1,33/2,24) \times 10^6$	$2,41 (2,03/2,87) \times 10^6$	$2,20 (1,23/2,56) \times 10^6$	$2,18 (1,83/2,59) \times 10^6$
Соскоб из зева	$2,32 (1,59/2,75) \times 10^6$	$1,70 (1,30/2,38) \times 10^6$	$1,73 (1,21/2,24) \times 10^6$	$2,22 (1,05/2,60) \times 10^6$

Использование непараметрического критерия Манна — Уитни для сравнения двух независимых групп переменных показало отсутствие статистически значимых достоверных различий при сравнении значений концентраций ДНК рода *Streptococcus species* в соскобах эпителиальных клеток из зева пациентов с язвами роговицы и кератитами ($Z = -1,805$, $p = 0,071$), тогда как в соскобах из носа такие различия были установлены ($Z = -2,959$, $p = 0,003$).

При сравнении значений концентраций ДНК рода *Staphylococcus species*: при использовании критерия Манна — Уитни статистически значимые достоверные различия в соскобах эпителиальных клеток из носа ($Z = -0,224$, $p = 0,823$) и зева ($Z = -0,476$, $p = 0,634$) пациентов с язвами роговицы и кератитами отсутствовали.

При проведении сравнительного анализа данных количественного определения ДНК микроорганизмов рода *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species* в офтальмологическом биологическом материале и в соскобах эпителиальных клеток из носа и зева были установлены статистически значимые достоверные ($p < 0,05$) различия концентраций в зависимости от биотопа взятия биологиче-

ского материала. Достоверно ($p < 0,05$) более высокие показатели (10^6 ГЭ/мл) в соскобах эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей и по сравнению с биологическим материалом из глаза (10^4 – 10^5 ГЭ/мл), по нашему мнению, позволяют идентифицировать верхние дыхательные пути в качестве первичного очага инфицирования при язвах роговицы и кератитах.

Таким образом, дальнейшие сравнительные исследования определения концентраций ДНК условно-патогенных микроорганизмов в офтальмологическом биологическом материале проводились без учета данных из носа и зева.

Так, при изучении значений концентраций ДНК рода *Streptococcus species* во внутриглазной жидкости, слезной жидкости и соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы пациентов с язвами роговицы были выявлены статистически значимые достоверные различия для групп «внутриглазная жидкость» — «слезная жидкость» ($Z = -4,897$, $p < 0,001$), «внутриглазная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -2,550$, $p = 0,011$), «слезная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -7,195$, $p < 0,001$).

При анализе значений концентраций ДНК рода *Streptococcus species* во внутриглазной жидкости, слезной жидкости и соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы пациентов с кератитами статистически значимые достоверные различия были выявлены для групп «внутриглазная жидкость» — «слезная жидкость» ($Z = -2,723$, $p = 0,006$), «слезная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -4,859$, $p < 0,001$), тогда как для групп «внутриглазная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» такие различия выявлены не были ($Z = -0,798$, $p = 0,425$).

При изучении значений концентраций ДНК рода *Staphylococcus species* во внутриглазной жидкости, слезной жидкости и соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы пациентов с язвами роговицы были выявлены статистически значимые достоверные различия для групп «внутриглазная жидкость» — «слезная жидкость» ($Z = -5,177$, $p < 0,001$), «внутриглазная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -3,170$, $p = 0,002$), «слезная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -7,192$, $p < 0,001$).

При анализе значений концентраций ДНК рода *Staphylococcus species* во внутриглазной жидкости, слезной жидкости и соскобах эпителиальных клеток из конъюнктивы пациентов с кератитами статистически значимые достоверные различия были выявлены для групп «внутриглазная жидкость» — «слезная жидкость» ($Z = -3,807$, $p < 0,001$) и «слезная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» ($Z = -4,636$, $p < 0,001$), тогда как для групп «внутриглазная жидкость» — «соскоб из конъюнктивы» такие различия выявлены не были ($Z = -1,093$, $p = 0,274$).

Таким образом, на основании проведенных исследований нами установлен спектр наиболее часто встречающихся этиологически значимых условно-патогенных возбудителей у пациентов с язвами роговицы и кератитами. Показано, что при кератитах микроорганизмы рода *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species* присутствуют в исследуемом биологическом материале в виде моноинфекции, тогда как язвы роговицы характеризуются присутствием указанных патогенов преимущественно в микст-состоянии.

Проведенный анализ полученных результатов молекулярно-микробиологических исследований позволяет сделать вывод о том, что при кератитах в качестве биологического материала можно использовать слезную жидкость как наименее травматичный способ получения и взятия биологического материала для исследования. В случаях язв роговицы рекомендуется в качестве биологического материала использовать соскоб их конъюнктивы или внутриглазную жидкость — по данным проведенных исследований концентрации ДНК микроорганизмов рода *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species* статистически значимо достоверно выше по сравнению с соскобом из конъюнктивы.

В связи с тем что в исследование были включены пациенты как с язвами собственной роговицы, так и с язвами роговичного трансплантата, последующий статистический анализ был проведен с учетом данной дифференциации (табл. 2).

Таблица 2

**Значения концентраций ДНК условно-патогенных микроорганизмов
в биологическом материале пациентов с язвами роговицы**

Table 2

**Values of opportunistic microorganisms' DNA concentrations
in biological material of patients with corneal ulcers**

Биологический материал	Концентрация <i>Streptococcus species</i> , ГЭ/мл (Me (Q25/75))		Концентрация <i>Staphylococcus species</i> , ГЭ/мл (Me (Q25/75))		Концентрация <i>Enterobacteriaceae</i> , ГЭ/мл (Me (Q25/75))	
	Язвы собственной роговицы	Язвы роговичного трансплантата	Язвы собственной роговицы	Язвы роговичного трансплантата	Язвы собственной роговицы	Язвы роговичного трансплантата
Внутриглазная жидкость	4,39 (3,19/4,63) × 10 ⁵	7,13 (4,65/7,07) × 10 ⁵	3,90 (3,02/4,77) × 10 ⁵	6,69 (4,61/7,88) × 10 ⁵	—	3,80 (3,37/4,13) × 10 ⁴
Слезная жидкость	2,61 (2,09/2,87) × 10 ⁵	4,01 (3,37/4,56) × 10 ⁵	2,47 (2,05/2,74) × 10 ⁵	3,70 (3,24/4,57) × 10 ⁵	—	3,33 (3,11/3,68) × 10 ⁴
Соскоб из конъюнктивы	4,50 (3,78/4,94) × 10 ⁵	7,15 (5,89/8,17) × 10 ⁵	4,75 (3,68/5,42) × 10 ⁵	7,66 (5,74/8,66) × 10 ⁵	—	4,65 (4,36/5,01) × 10 ⁴
Соскоб из носа	1,89 (1,36/2,21) × 10 ⁶	1,71 (1,312/2,47) × 10 ⁶	2,01 (1,23/2,48) × 10 ⁶	2,29 (1,28/2,66) × 10 ⁶	—	3,18 (3,03/3,39) × 10 ⁵
Соскоб из зева	2,43 (1,43/2,87) × 10 ⁶	2,19 (1,34/2,53) × 10 ⁶	1,62 (1,25/1,85) × 10 ⁶	2,09 (1,00/2,33) × 10 ⁶	—	3,24 (3,01/3,49) × 10 ⁵

Использование непараметрического критерия Манна — Уитни для сравнения двух независимых групп переменных показало отсутствие статистически значимых достоверных различий при сравнении значений концентраций в соскобах эпителиальных клеток из носа и зева пациентов с язвами собственной роговицы и с язвами роговичного трансплантата как ДНК рода *Streptococcus species* ($Z = -0,354$, $p = 0,724$ и $Z = -1,414$, $p = 0,157$ соответственно), так и ДНК рода *Staphylococcus species* ($Z = -0,700$, $p = 0,484$ и $Z = -0,665$, $p = 0,506$ соответственно).

При этом нами были установлены статистически значимые достоверные различия концентраций ДНК рода *Streptococcus species* и ДНК рода *Streptococcus species* во внутриглазной жидкости ($Z = -4,331$, $p < 0,001$ и $Z = -4,119$, $p < 0,001$ соответственно), слезной жидкости ($Z = -5,510$, $p < 0,001$ и $Z = -4,884$, $p < 0,001$ соответственно) и соскобе из конъюнктивы ($Z = -5,440$, $p < 0,001$ и $Z = -4,389$, $p < 0,001$ соответственно) при сравнении пациентов с язвами собственной роговицы и с язвами роговичного трансплантата.

Также обращает на себя внимание и факт микробного инфицирования пациентов с язвами роговичного трансплантата возбудителями представителями семейства *Enterobacteriaceae*.

Заключение

В ходе проведения молекулярно-генетических исследований установлена структура бактериального инфицирования различного биологического материала пациентов с язвами роговицы и кератитами. Этиологически значимыми микроорганизмами при язвах роговицы являются представители рода *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species*, которые были выявлены в офтальмологическом биологическом материале пациентов с язвами собственной роговицы в $80,00 \pm 8,20 \%$ и $70,00 \pm 7,56 \%$ случаев соответственно (в $50,00 \pm 6,71 \%$ случаев данные возбудители детектировались в составе микст-инфекции) и в $78,57 \pm 8,36 \%$ и $64,29 \pm 7,65 \%$ случаев соответственно в биологическом материале пациентов с язвами роговичного трансплантата. При кератитах в офтальмологическом биологическом материале частота выявления ДНК *Streptococcus species* составила $57,89 \pm 7,18 \%$, рода *Staphylococcus species* — $42,11 \pm 6,22 \%$; при этом во всех образцах указанные возбудители присутствовали в виде моноинфекции.

При проведении последующих исследований по дифференциальной диагностике представителей рода *Staphylococcus species* было показано, что при язвах собственной роговицы выявлялись метициллин-чувствительные *Staphylococcus aureus* ($28,57 \pm 5,24 \%$, $n=8$; 4 пациента), метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($28,57 \pm 5,24 \%$, $n=8$; 4 пациента) и метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus species* ($42,86 \pm 6,35 \%$, $n=12$; 6 пациентов). При язвах роговичного трансплантата выявлялись метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($33,33 \pm 5,69 \%$, $n=6$; 3 пациента), которые были в ассоциации с *Enterobacteriaceae*, и метициллин-резистентные коагулазонегативные *Staphylococcus species* ($66,67 \pm 7,92 \%$, $n=12$; 6 пациентов), которые были в ассоциации с *Streptococcus species*. При кератитах нами были выявлены метициллин-чувствительные *Staphylococcus aureus* ($57,14 \pm 7,41 \%$, $n=8$; 4 пациента) и метициллин-резистентные *Staphylococcus aureus* ($42,86 \pm 6,45 \%$, $n=6$; 3 пациента).

Сравнительный анализ данных количественного определения ДНК микроорганизмов рода *Streptococcus species* и рода *Staphylococcus species* в офтальмологическом биологическом материале и в соскобах эпителиальных клеток из зева и носа показал наличие статистически значимых достоверных ($p < 0,05$) различий концентраций ДНК исследуемых патогенов в зависимости от биотопа взятия биологического материала. При этом достоверно ($p < 0,05$) более высокие показатели (10^6 ГЭ/мл) в соскобах эпителиальных клеток из верхних дыхательных путей и по сравнению с биологическим материалом из глаза (10^4 — 10^5 ГЭ/мл), по нашему мнению, позволяют идентифицировать верхние дыхательные пути в качестве первичного очага инфицирования при язвах роговицы и кератитах.

Финансирование. Это исследование не получало внешнего финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This study received no external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Список литературы

1. Ting D. S. J., Ho C. S., Deshmukh R., Said D. G., Dua H. S. Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. Eye. 2021, 35(4), 1084—1101, DOI: 10.1038/s41433-020-01339-3.

2. Bharat G., Kirandeep K. Bacterial Keratitis. StatPearls. StatPearls Publishing: Treasure Island (FL). 2024.
3. Нероев В. В., Катаргина Л. А., Яни Е. В., Вахова Е. С., Позднякова В. В., Ковалева Л. А., Селиверстова К. Е., Якушина Л. Н. Бактериальные язвы роговицы [Электронный ресурс]. Федеральные клинические рекомендации, 2017. https://oofd72.ru/upload/documents/5-Bakterialnye-yazvy-rogovitsy-KR_101_Bakterialnye_yazvy_rogovicy.pdf
4. Шаимова В. А. Клинико-этиологические особенности различных типов течения гнойной язвы роговицы. Вест. Офтальмологии. 2002, 1, 39—41.
5. Ting D. S. J., Ho C. S., Deshmukh R., Said D. G., Dua H. S. Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. Eye (Lond). 2021, 35, 2908, DOI: 10.1038/s41433-021-01568-0.
6. Ong S. H., Corbett M. C. Corneal infections in the 21st century. Postgrad. Med. J. 2015, 91(1080), 565—571, DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133323.
7. Hafezi F., Randleman J. B. PACK-CXL: defining CXL for infectious keratitis. J. Refract. Surg. 2014, 30, 438-439, DOI: 10.3928/1081597X-20140609-01.
8. Al Mahmoud T., Elhanan M., Elshamsy M. H., Alshamsi H. N., Abu-Zidan F. M. Management of infective corneal ulcers in a high-income developing country. Medicine (Baltimore). 2019, 98(51), e18243, DOI: 10.1097/MD.00000000000018243.
9. Ung L., Bispo P. J. M., Shanbhag S. S., et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. Surv. Ophthalmol. 2019, 64(3), 255—271, DOI: 10.1016/j.survophthal.2018.12.003.
10. Stapleton F. Contact lens-related corneal infection in Australia. Clin. Exp. Optom. 2020, 103(4), 408—417, DOI: 10.1111/cxo.13082.
11. Carnt N., Hoffman J. M., Verma S., Hau S., Radford C. F., Minassian D. C., et al. Acanthamoeba keratitis: confirmation of the UK outbreak and a prospective case-control study identifying contributing risk factors. Br. J. Ophthalmol. 2018, 102(12), 1621—1628, DOI: 10.1136/bjophthalmol-2018-312544.
12. Ting D. S. J., Cairns J., Gopal B. P., Ho C. S., Krstic L., Elsahn A., et al. Risk factors, clinical outcomes, and prognostic factors of bacterial keratitis: the Nottingham infectious keratitis study. Front. Med. (Lausanne). 2021, 8, 715118, DOI: 10.3389/fmed.2021.715118.
13. Niu L., Liu X., Ma Z., Yin Y., Sun L., Yang L., et al. Fungal keratitis: pathogenesis, diagnosis and prevention. Microb. Pathog. 2020, 138, 103802, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103802.
14. Наследов А. Д. SPSS 15: профессиональный статистический анализ данных. Питер: СПб. 2008, 416 с., ISBN 978-5-388-00193-1.
15. Ситник Г. В. Современные подходы к лечению язв роговицы. Медицинский журнал. 2007, 4, 100—104.
16. Altan-Yaycioglu R., Poyraz S. Bilateral disciform keratitis of presumed adenoviral etiology. Indian J. Ophthalmol. 2018, 66(1), 132—134, DOI: 10.4103/ijo.IJO_688_17.
17. Subedi D., Vijay A. K., Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. Clin. Exp. Optom. 2018, 101(2), 162—171, DOI: 10.1111/cxo.12621.
18. Cabrera-Aguas M., Khoo P., George C. R. R., Lahra M. M., Watson S. L. Antimicrobial resistance trends in bacterial keratitis over 5 years in Sydney, Australia. Clin. Exp. Ophthalmol. 2020, 48(2), 183—191, DOI: 10.1111/ceo.13672.

19. Xu S., Guo D., Liu X., Jin X., Shi Y., Wang Y., et al. Ocular pathogens and antibiotic resistance in microbial keratitis over three years in Harbin, Northeast China. *Acta Ophthalmol.* 2021, 99(8), 909–915, DOI: 10.1111/aos.14789.
20. Mehraj J., Witte W., Akmatov M. K., Layer F., Werner G., Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Patterns in the Community. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016, 398, 55–87, DOI: 10.1007/82_2016_497.
21. Somerville T. F., Shankar J., Aldwinckle S., Sueke H., Neal T., Horsburgh M. J., et al. Recurrent microbial keratitis and endogenous site *Staphylococcus aureus* colonisation. *Sci. Rep.* 2020, 10(1), 18559, DOI: 10.1038/s41598-020-75821-z.
22. Varley C. D., Deodhar A. A., Ehst B. D., Bakke A., Blauvelt A., Vega R., et al. Persistence of *Staphylococcus aureus* colonization among individuals with immune-mediated inflammatory diseases treated with TNF- α inhibitor therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 2014, 53(2), 332–337, DOI: 10.1093/rheumatology/ket351.
23. Chang V. S., Dhaliwal D. K., Raju L., Kowalski R. P. Antibiotic Resistance in the Treatment of *Staphylococcus aureus* Keratitis: a 20-Year Review. *Cornea*. 2015, 34(6), 698–703, DOI: 10.1097/ICO.0000000000000431.
24. Khor W. B., Lakshminarayanan R., Periyah M. H., Prajna V. N., Garg P., Sharma N., et al. The antibiotic resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia Cornea Society Infectious Keratitis Study. *Int. Ophthalmol.* 2024, 44(1), 361, DOI: 10.1007/s10792-024-03270-y.
25. Asbell P. A., Sanfilippo C. M., Sahm D. F., DeCory H. H. Trends in Antibiotic Resistance Among Ocular Microorganisms in the United States From 2009 to 2018. *JAMA Ophthalmol.* 2020, 138(5), 439–450, DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2020.0155.
26. Nithya V., Rathinam S., Karthikeyan R. S.G., Lalitha P. A ten-year study of prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and genotypic characterization of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing ocular infections in a tertiary eye care hospital in South India. *Infect. Genet. Evol.* 2019, 69, 203–210, DOI: 10.1016/j.meegid.2019.01.031.

Об авторах

Ольга Сергеевна Полуян, доцент, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетической диагностики Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь.

ORCID: 0000-0001-7130-2776

Светлана Андреевна Костюк, профессор, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетической диагностики Научно-исследовательского института экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь.

ORCID: 0000-0002-3252-2626

Михаил Юрьевич Ревтович, доцент, доктор медицинских наук, проректор по научной работе, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь.

ORCID: 0000-0001-7202-6902

The authors

Olga S. Poluyan, Associate Professor, PhD in Biology, Leading Researcher of Laboratory of molecular genetic diagnostics of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of educational institution «Belarusian State Medical University», Republic of Belarus.

ORCID: 0000-0001-7130-2776

Svetlana A. Kostiuk, Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of molecular genetic diagnostics of the Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of educational institution «Belarusian State Medical University», Republic of Belarus.

ORCID: 0000-0002-3252-2626

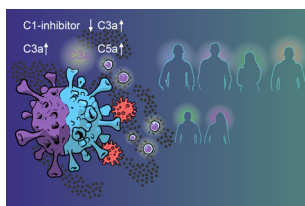
Mikhail Yu. Revtovich, Associate Professor, Doctor of Medical Sciences, Vice-Rector for Scientific work of educational institution «Belarusian State Medical University», Republic of Belarus.

ORCID: 0000-0001-7202-6902

Оригинальная исследовательская статья

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ И ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

В. С. Марченко*



Челябинский государственный университет,
454000, Россия, Челябинск

* Автор-корреспондент: violettamarcheko2001@gmail.com

Для цитирования:

Марченко В. С. Особенности системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусной инфекцией. *Современные направления в биомедицине*. 2025;1(2):77—88.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-5>

Поступила
04.05.2025 г.
Прошла рецензирование
16.06.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Марченко В. С., 2025

Резюме: Начало пандемии COVID-19, объявленной в марте 2020 г., вызвало серьезную обеспокоенность во всем мире. Тогда мало кто мог предвидеть, что вирус способен перейти в хроническую форму, но вскоре термин «постковидный синдром» получил широкое признание в научной и медицинской среде. Было зафиксировано, что к 2023 г. количество случаев COVID-19 значительно снизилось по сравнению со значениями 2020—2022 гг. Однако после того как пациенты перенесли COVID-19, многие стали сталкиваться с ухудшением состояния здоровья, развитием осложнений и реактивацией хронических инфекций, таких как герпесвирусная и папилломавирусная инфекции.

Вирусы герпеса способны переходить в латентное, хроническое состояние в клетках нервной и иммунной систем, ожидая триггерной ситуации для реактивации в виде ослабления общего иммунитета.

Система комплемента и нейтрофилы являются звеньями врожденного иммунитета и взаимодействуют между собой. Однако данные о функционировании системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов при постковидном синдроме, особенно в сочетании с хронической герпесвирусной инфекцией, остаются ограниченными. Эти причины подчеркивают важность текущего исследования и стимулируют дальнейшее изучение данной области.

Ключевые слова: вирус SARS-CoV-2, COVID-19, постковидный синдром, герпесвирусная инфекция, система комплемента, фагоцитарная активность нейтрофилов, нитросиний тетразолий (НСТ), активность нейтрофилов



Original research article

FEATURES OF THE COMPLEMENT SYSTEM AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME AND HERPESVIRUS INFECTION

V. S. Marchenko*

Chelyabinsk State University,
454000, Chelyabinsk, Russia

* Correspondence: violettamarcheko2001@gmail.com

To cite this article:

Marchenko V. S. Features of the complement system and phagocytic activity of neutrophils in patients with post-covid syndrome and herpesvirus infection. *Advanced targets in Biomedicine*. 2025;1(2):77—88.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-5>

Received
04.05.2025
Revised
16.06.2025
Accepted
01.09.2025
Published
08.12.2025

© Marchenko V. S., 2025

Abstract: The outbreak of the COVID-19 pandemic, announced in March 2020, caused unprecedented alarm among people around the world. At that time, few people could have predicted that the virus was capable of becoming chronic, but soon the term "cystic syndrome" was widely recognized in the scientific and medical community. It was recorded that by 2023, the number of COVID-19 cases had significantly decreased compared to the peak values of 2020—2022. However, after patients suffered from COVID-19, many began to face a deterioration in their health, the development of complications and the reactivation of chronic infections such as herpes virus and papillomavirus infections. Herpes viruses are able to enter a latent, chronic state in the cells of the nervous and immune systems, waiting for a trigger situation for reactivation, in the form of a weakening of the general immune system. The complement system and neutrophils are links of innate immunity and interact with each other. However, data on the functioning of the complement system and the phagocytic activity of neutrophils in postcovid syndrome, especially in combination with chronic herpesvirus infection, remain limited. These reasons highlight the importance of the current research and encourage further study of the field.

Keywords: SARS-CoV-2 virus, COVID-19, post-COVID syndrome, herpesvirus infection, complement system, neutrophils' phagocytic activity, neutrophils' NBT-activity

Введение

В марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале пандемии COVID-19, что вызвало серьезную обеспокоенность во всем мире. Эпидемия создала беспрецедентную стрессовую ситуацию для общества [1].

Первоначально было трудно предсказать, что вирус может перейти в хроническое состояние, однако впоследствии термин «постковидный синдром» получил широкое распространение в научных и медицинских кругах. В 2023 г. заболеваемость COVID-19 значительно снизилась по сравнению с показателями 2020—2022 гг. [2].

В марте 2025 г. количество заболевших COVID-19, по данным ВОЗ, составило 52 223 человека, из них 8508 человек — в Российской Федерации [3]. После перенесенного COVID-19 наблюдается значительное увеличение частоты ухудшения состояния здоровья пациентов с развитием осложнений и реактивацией хронических заболеваний, таких как герпесвирусные и папилломавирусные инфекции [4].

Постковидный синдром (post-COVID-19 syndrome) — это состояние, при котором симптомы возникают во время или после инфекции COVID-19, сохраняются на протяжении более 12 недель и не могут быть связаны с другими заболеваниями. Этот синдром отличается длительным и хроническим течением [5]. Глобальный систематический обзор заболеваемости демонстрирует, что к концу апреля 2024 г. количество больных постковидным синдромом составляло 41,8 % [6]. В связи с продолжающимся выявлением постковидного синдрома у пациентов и его воздействием на дыхательную, сердечно-сосудистую [7], эндокринную [8], нервную, мочевыделительную системы [9], желудочно-кишечный тракт и другие органы и системы органов исследователи по всему миру активно изучают не только саму коронавирусную инфекцию, но и ее последствия [10].

Согласно статистическим данным, примерно 90 % населения Земли являются носителями одного или нескольких видов герпесвирусной инфекции. Герпес атакует клетки мукозального иммунитета, включая эпителиальные клетки, макрофаги, В-лимфоциты и Т-лимфоциты, после чего локализуется в длительно живущих клетках нервной и иммунной систем. Вирус переходит в латентное состояние, выжидая воздействие триггера, способного спровоцировать его реактивацию [11]. К такому триггеру относится снижение системного иммунитета в результате травм, хирургических вмешательств, половых контактов с повреждением слизистых оболочек. Эти факторы приводят к возникновению разнообразных клинических проявлений [11—13].

Исследование врожденного и адаптивного иммунитета при постковидном синдроме и герпесвирусной инфекции имеет ключевое значение для создания эффективных методов диагностики, лечения и поддержания иммунной системы.

Ранее считалось, что основная задача нейтрофилов — защита организма от бактериальных и грибковых инфекций. Однако современные исследования обнаружили, что эти клетки также активно участвуют в борьбе с вирусами путем выделения цитокинов, которые подавляют размножение вирусов [14; 15], и создания внеклеточных ловушек, способных также вызывать повреждение тканей и играть роль в развитии острых респираторных дистресс-синдромов [16]. Нейтрофилы — важный элемент врожденного иммунитета, имеющий значительный вес в противовирусной защите организма. Они обладают фагоцитарной и бактерицидной активностью, участвуют в антигенной презентации и при чрезмерной активации могут вызвать цитокиновый шторм [14; 15]. Нейтрофилы играют важную роль в иммунной системе при постковидном синдроме, так как являются ключевым звеном не только врожденного, но и адаптивного иммунного ответа [17]. Нарушения в их функционировании могут возникать как во

время инфекции, так и в постинфекционный период. Эти сбои могут привести к неадекватным иммунным реакциям, что усугубляет течение COVID-19 и способствует развитию осложнений [18].

Система комплемента представляет собой один из ключевых компонентов гуморального иммунитета, оказывающий значительное влияние на различные аспекты иммунного ответа. Комплемент состоит из сывороточных и мембранных белков, которые выполняют множество значимых функций. Среди них — запуск и усиление воспалительных процессов, активация фагоцитоза, привлечение фагоцитов через хемотаксис, удаление иммунных комплексов, активация клеток, прямое разрушение патогенных микроорганизмов и содействие в синтезе антител [19; 20]. Компоненты комплемента запускают воспалительные процессы, активируя врожденную иммунную систему, а также усиливают работу адаптивного иммунитета [21; 22].

Нейтрофилы и система комплемента являются звеньями иммунного ответа, которые тесно взаимодействуют для обеспечения эффективного иммунного ответа. Синергия между нейтрофилами и системой комплемента обеспечивает быстрое и эффективное уничтожение патогенов, а также регуляцию воспалительных процессов. В настоящее время недостаточно данных о характере функционирования системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов при постковидном синдроме, особенно в сочетании с хронической герпесвирусной инфекцией. Это подчеркивает значимость настоящего исследования и обосновывает необходимость дальнейшего изучения данной темы.

Целью исследования является изучение особенностей системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов у постковидных пациентов с герпесвирусной инфекцией.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать показатели системы комплемента у пациентов, перенесших и не болевших COVID-19, с учетом наличия или отсутствия в анамнезе герпесвирусной инфекции.
2. Проанализировать показатели фагоцитарной и НСТ (нитросиний тетразолий)-активности нейтрофилов у пациентов, перенесших и не болевших COVID-19, с учетом наличия или отсутствия в анамнезе герпесвирусной инфекции.
3. Выявить различия в выделенных группах пациентов и их параметрах системы комплемента, фагоцитарной активности и НСТ-активности нейтрофилов.

Материалы и методы исследования

Было проведено исследование показателей 64 пациентов в возрастном диапазоне от 18 до 65 лет. В выборку включались лица, не болевшие COVID-19, перенесшие данное заболевание, а также пациенты с наличием и отсутствием герпесвирусной инфекции.

Критериями включения в исследование были подтвержденный диагноз инфекции SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), наличие иммуноглобулинов классов А, М и G к вирусу SARS-CoV-2, подтвержденная герпесвирусная инфекция методом ПЦР в слюне или крови, а также выявление иммуноглобулинов М и G к одному из вирусов герпеса, подтвержденные данными из системы БАРС.

Исследование было проведено спустя не менее шести месяцев после инфицирования SARS-CoV-2.

Группы сравнения были сформированы, исходя из различий в уровнях С1-ингибитора, фрагментов С3а и С5а комплемента у пациентов с вирусом герпеса и без герпесвирусной инфекции, которые перенесли или не болели COVID-19. Учитывались изменения показателей фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число), НСТ-активности нейтрофилов (НСТ-спонтанная активность, НСТ-спонтанный индекс, НСТ-индуцированная активность и НСТ-индуцированный индекс) у пациентов, которые перенесли и не болели COVID-19, с лабораторно подтвержденным вирусом герпеса и у лиц без герпесвирусной инфекции в анамнезе.

Участники исследования исключались при наличии острых респираторных вирусных инфекций, подтвержденного диагноза вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и вирусных гепатитов.

В результате были созданы четыре группы для сравнительного анализа:

1) группа 1 — пациенты, не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию, $n = 16$;

2) группа 2 — пациенты, не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию, $n = 16$;

3) группа 3 — пациенты, перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию, $n = 16$;

4) группа 4 — пациенты, перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию, $n = 16$.

Клинические исследования

Анкетирование пациентов проводилось с помощью анкеты иммунологического мониторинга пациентов, данных историй болезни из программы для ЭВМ «БАРС.ЗДРАВООХРАНЕНИЕ-МИС» ГАУЗ ОТКЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Челябинска.

Иммунологические исследования

Определение уровня С1-ингибитора, фрагмента С3а и фрагмента С5а комплемента было проведено методом иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого использовались наборы реагентов производства компании «Вектор-Бест» (Россия), предназначенные для иммуноферментного определения концентраций С1-ингибитора, фрагмента С3а и фрагмента С5а комплемента в сыворотке крови.

Для оценки фагоцитарной активности и НСТ-активности нейтрофилов у пациентов с постковидным синдромом и/или герпесвирусной инфекцией, использовались тест с частицами латекса диаметром 1,7 мкм и НСТ-тест [23]. Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали по их способности поглощать частицы латекса.

Определение фагоцитарной и НСТ-активности проводилось морфологическим методом (световая микроскопия с использованием микроскопов Olympus (Япония)).

Статистическая обработка данных

Обработка и анализ данных лабораторных исследований осуществлялись с помощью Microsoft Excel версии 16.16.27 (201012). Ввиду малого объема выборок использованные статистические критерии были непараметрическими. Поэтому для оценки достоверности различий использовался критерий Манна — Уитни (U) [24; 25] и изменения считались значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты исследования

Первым этапом работы был расчет рангов по критерию Манна — Уитни согласно уровню С1-ингибитора, С3а фрагмента комплемента и С5а фрагмента комплемента в группах пациентов, перенесших и не болевших COVID-19, с клинически и лабораторно подтвержденным вирусом герпеса и у лиц без герпесвирусной инфекции в анамнезе.

На втором этапе работы был проведен расчет изменений уровней С1-ингибитора, С3а фрагмента комплемента и С5а фрагмента комплемента в группах пациентов, перенесших и не болевших COVID-19, с подтвержденным вирусом герпеса и у лиц без герпесвирусной инфекции в анамнезе при уровне достоверности $p < 0,05$ (табл. 1).

Таблица 1

Различие в значениях С1-ингибитора, С3а и С5а фрагментов комплемента в группах пациентов, болевших и не болевших COVID-19, с наличием или отсутствием герпесвирусной инфекции, при уровне достоверности $p < 0,05$

Table 1

Differences in the values of C1-inhibitor, C3a and C5a complement fragments in groups of patients who had and had not had COVID-19, with or without herpesvirus infection, at a significance level of $p < 0.05$

Показатель	Группа 1* n = 16	Группа 2* n = 16	Группа 3* n = 16	Группа 4* n = 16	p**
Уровень С1-ингибитора, мкг/мл	254,61 ± 15,92	267,78 ± 20,5	237,34 ± 14,39	236,35 ± 13,53	< 0,05 ₂₋₄
Уровень С3а фрагмента комплемента, нг/мл	116,86 ± 7,82	166,73 ± 11,35	111,87 ± 5,77	126,95 ± 7,92	< 0,05 ₁₋₂ < 0,05 ₂₋₄
Уровень С5а фрагмента комплемента, нг/мл	17,98 ± 2,97	13,98 ± 1,93	25,25 ± 3,44	17,54 ± 2,64	< 0,05 ₁₋₃ < 0,05 ₂₋₃ < 0,05 ₃₋₄

Примечание: * группа 1 — пациенты, не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 2 — пациенты, не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 3 — пациенты, перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 4 — пациенты, перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; ** достоверность различий ($p < 0,05$).

Обработка данных проводилась с применением стандартных методик, включая расчет среднего арифметического значения (М) для вариационного ряда и определение стандартной ошибки среднего (m). Результаты количественного анализа для сравнительных групп представлены в формате $M \pm m$.

Согласно данным, приведенным в таблице 1, самый низкий уровень С1-ингибитора наблюдается в группе 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию), тогда как самый высокий зафиксирован в группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию).

Концентрация фрагмента комплемента С3а выше в группах 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 4 (пе-

перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию), при этом в группе 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) она гораздо ниже, чем в группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию). Наименьшее значение С3а фрагмента комплемента по сравнению с другими группами демонстрируется в группе 3 (перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию).

Самый высокий уровень фрагмента комплемента С5а выявлен в группе 3 (перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию), в то время как в группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) наблюдается самый низкий уровень. Группы 1 (не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) демонстрируют схожие значения этого показателя.

Третий этап работы заключался в подсчете рангов по критерию Манна — Уитни, согласно уровню фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число), НСТ-активности нейтрофилов (НСТ-спонтанная активность, НСТ-спонтанный индекс, НСТ-индуцированная активность и НСТ-индуцированный индекс) у пациентов, которые перенесли и не болели COVID-19, с подтвержденным вирусом герпеса и у лиц без герпесвирусной инфекции в анамнезе.

Заключительный (четвертый) этап исследования включал проверку достоверности данных путем расчета различий уровней показателей фагоцитарной активности нейтрофилов (активность, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число) и НСТ-активности нейтрофилов (НСТ-спонтанная активность, НСТ-спонтанный индекс, НСТ-индуцированная активность и НСТ-индуцированный индекс) у пациентов, перенесших COVID-19, не болевших COVID-19, с подтвержденным вирусом герпеса и у лиц без герпесвирусной инфекции в анамнезе при уровне достоверности $p < 0,05$ (табл. 2).

Таблица 2

Различие в уровнях фагоцитарной активности и НСТ-активности нейтрофилов у пациентов, болевших и не болевших COVID-19, с наличием или отсутствием герпесвирусной инфекции, при уровне достоверности $p < 0,05$

Table 2

Differences in the levels of phagocytic activity and NBT-activity of neutrophils in patients who had and had not had COVID-19, with or without herpesvirus infection, at a significance level of $p < 0,05$

Показатель	Группа 1* n = 16	Группа 2* n = 16	Группа 3* n = 16	Группа 4* n = 16	p**
Активность фагоцитоза нейтрофилов	50,06 ± 3,15	50,69 ± 4,47	40,13 ± 3,03	39,13 ± 2,66	< 0,05 _{2–4}
Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов					< 0,05 _{1–3} < 0,05 _{1–4} < 0,05 _{2–3} < 0,05 _{2–4}
	1,82 ± 0,28	2,33 ± 0,66	1,14 ± 0,21	1,22 ± 0,27	

Окончание табл. 2

Показатель	Группа 1* n = 16	Группа 2* n = 16	Группа 3* n = 16	Группа 4* n = 16	p**
Фагоцитарное число нейтрофилов	3,52±0,44	3,91±0,67	2,88±0,57	2,87±0,46	<0,05 ₁₋₃ <0,05 ₂₋₃ <0,05 ₂₋₄
НСТ-спонтанная актив- ность	20,50±3,20	22,06±3,82	17,31±2,82	18,06±2,44	>0,05
НСТ-спонтанный индекс	0,29±0,05	0,36±0,07	0,26±0,05	0,29±0,05	>0,05
НСТ-индуцированная активность	52,19±5,06	42,63±3,52	54,88±4,27	52,50±3,65	<0,05 ₂₋₃
НСТ-индуцированный индекс	0,68±0,07	0,71±0,06	0,70±0,06	0,68±0,07	>0,05

Примечание: * группа 1 — пациенты, не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 2 — пациенты, не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 3 — пациенты, перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; группа 4 — пациенты, перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию; ** достоверность различий ($p < 0,05$).

Согласно данным, приведенным в таблице 2, минимальное значение активности фагоцитоза по сравнению с другими группами наблюдается у группы 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию). Разница между группами 1 (не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) незначительна.

Снижение уровня интенсивности фагоцитоза определяется в группе 3 (перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию), с незначительным отрывом показатель выше в группе 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию). В группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) показатель выше по сравнению с остальными группами.

Зафиксировано снижение уровня фагоцитарного числа в группе 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) при сравнении с остальными группами. При этом разница между показателем в группах 3 (перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) незначительна.

НСТ-спонтанная активность у пациентов группы 3 (перенесшие COVID-19, но не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) снижается, и разница между значениями незначительна.

НСТ-спонтанный индекс в группе 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) повышается до такого же уровня, как и в группе 1 (не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию). При этом в этих двух показателях максимальное значение наблюдается в группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию).

Низкий показатель НСТ-индуцированной активности наблюдается в группе 2 (не болевшие COVID-19, но имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию), а значения данного показателя в группе 3 (перенесшие COVID-19, но не

имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) и 4 (перенесшие COVID-19 и имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию) приближены к группе 1 (не болевшие COVID-19 и не имеющие в анамнезе герпесвирусную инфекцию).

Разница уровней НСТ-индуцированного индекса между группами незначительна.

Обсуждение

Снижение уровня С1-ингибитора наблюдается у пациентов, которые перенесли COVID-19 и имеют герпесвирусную инфекцию в анамнезе, тогда как максимальное значение зафиксировано у пациентов, которые не болели COVID-19, но имеют клинически и лабораторно подтвержденную герпесвирусную инфекцию в анамнезе. Это указывает на снижение регуляции системы комплемента и ослабление защиты организма от воспалительных реакций. Предполагается, что у пациентов с герпесвирусной инфекцией и не имеющих COVID-19 в анамнезе иммунная система сохраняет способность поддерживать гомеостаз и регулировать вышеупомянутые процессы.

Полученные результаты статистического анализа показывают, что у пациентов с постковидным синдромом и герпесвирусной инфекцией наблюдается повышение концентрации С3а фрагмента комплемента, тогда как у лиц, перенесших COVID-19, выявляется повышение С5а фрагмента комплемента, и это происходит за счет снижения уровня С1-ингибитора комплементарной системы. Это, в свою очередь, может усугубить течение и инфекционных, и иных заболеваний.

Следует уточнить, что длительное снижение С1-ингибитора и повышение С3а и С5а фрагментов комплемента также могут способствовать развитию аутоиммунных нарушений. В связи с этим пациенты, перенесшие COVID-19, и/или с вирусом герпеса в анамнезе подвержены риску аутоиммунных осложнений.

Снижение показателей активности фагоцитоза и фагоцитарного числа нейтрофилов по сравнению с другими группам наблюдается у пациентов, перенесших COVID-19 и имеющих в анамнезе герпесвирусную инфекцию. Самый низкий показатель интенсивности фагоцитоза определяется у пациентов с постковидным состоянием и без клинически и лабораторно подтвержденной герпесвирусной инфекции, что говорит о повреждении иммунного ответа у лиц с постковидным синдромом.

Хроническое течение COVID-19 может вызывать иммуносупрессию и дисфункцию врожденного иммунитета. Это проявляется в снижении фагоцитарной активности и бактерицидной способности нейтрофилов, что может приводить к ухудшению общего иммунного ответа организма и способствовать развитию длительных воспалительных процессов.

Выводы

Статистический анализ данных показал следующие изменения в системе комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов.

1. Наличие постковидного синдрома значительно снижает уровень С1-ингибитора, особенно в сочетании с герпесвирусной инфекцией. Это свидетельствует об ухудшении регуляции системы комплемента и ослаблении защиты организма от воздействия воспалительных реакций.

2. Повышенный уровень С3а фрагмента комплемента у пациентов, перенесших COVID-19, и С5а фрагмента комплемента у лиц с постковидным синдромом и герпесвирусной инфекцией происходит за счет дефицита С1-ингибитора. Это

может усугубить течение инфекционного процесса, а длительное сохранение таких показателей системы комплемента способно привести к увеличению риска возникновения аутоиммунных осложнений постковидного синдрома.

3. На уменьшение показателей фагоцитарной и НСТ-активности нейтрофилов непосредственно влияет постковидный синдром и как дополнительный отягощающий фактор герпесвирусная инфекция, что приводит к снижению данной функции нейтрофилов и повреждению врожденного иммунного ответа у лиц, перенесших COVID-19.

4. У пациентов, перенесших COVID-19, отмечается длительная иммунодепрессия, при которой нарушения врожденного иммунного ответа сохраняются более шести месяцев после заболевания. Это состояние приобретает хроническую форму.

Заключение

Присутствие герпесвирусной инфекции осложняет течение постковидного синдрома, что подтверждается результатами анализа системы комплемента и фагоцитарной активности нейтрофилов. Из этого следует, что первичное терапевтическое вмешательство должно быть направлено на лечение герпесвирусной инфекции с целью снижения тяжести осложнений, возникающих на фоне постковидного синдрома. Это указывает на необходимость более детального изучения иммунного статуса пациентов для разработки персонализированного подхода к иммунокоррекции, учитывая их герпесвирусный анамнез.

Финансирование. Это исследование не получало внешнего финансирования.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Funding. This study received no external funding.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Список литературы

1. Jimeno-Almazán A., Pallarés J. G., Buendía-Romero Á., Martínez-Cava A., Franco-López F., Sánchez-Alcaraz Martínez B. J., et al. Post-COVID-19 Syndrome and the Potential Benefits of Exercise. *Int. J. Environ. Res. Public. Health*. 2021, 18(10), 5329, DOI: 10.3390/ijerph18105329.
2. Семенова Е. В., Павлюк В. В. Особенности гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19. *Медицинская иммунология*. 2022, 24(2), 337–350, DOI: 10.15789/1563-0625-FOH-2452.
3. WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard. COVID-19 deaths (dashboard), URL: <https://www.who.int/> (дата обращения: 01.05.2025).
4. Добрынина М. А., Ибрагимов Р. В., Крицкий И. С. Изучение фенотипических параметров иммунной системы у больных с постковидным синдромом иммунопатологии. Сборник материалов международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, Москва. 2023, 1, 119–121.
5. Канорский С. Г. Постковидный синдром: распространенность и патогенез органических поражений, направления коррекции. Систематический обзор. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2021, 28(6), 90–116, DOI: 10.25207/1608-6228-2021-28-6-90-116.

6. Razak R. S. A., Ismail A., Aziz A. F. A., Suddin L. S., Azzeri A., Sha'ari N. I. Post-COVID syndrome prevalence: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2024, 24(1), 1785, DOI: 10.1186/s12889-024-19264-5.

7. Salisbury R., Iotchkova V., Jaafar S., Morton J., Sangha G., Shah A., et al. Incidence of symptomatic, image-confirmed venous thromboembolism following hospitalization for COVID-19 with 90-day follow-up. *Blood Advances*. 2020, 4(24), 6230–6239, DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003349.

8. Suwanwongse K., Shabarek N. Newly diagnosed diabetes mellitus, DKA, and COVID-19: causality or coincidence? A report of three cases. *Journal of Medical Virology*. 2021, 93(2), 1150–1153, DOI: 10.1002/jmv.26339.

9. Robbins-Juarez S. Y., Qian L., King K. L., Stevens J. S., Husain S. A., Radhakrishnan J., et al. Outcomes for patients with COVID-19 and acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney International Reports*. 2020, 5(8), 1149–1160, DOI: 10.1016/j.ekir.2020.06.013.

10. Yong S. J. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. *Infect. Dis. (Lond)*. 2021, 53(10), 737–754, DOI: 10.1080/23744235.2021.1924397.

11. Козлов В. А., Тихонова Е. П., Савченко А. А., Кудрявцев И. В., Андропова Н. В., Анисимова Е. Н., и др. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. ООО «Издательство Поликор»: Красноярск. 2021, 28–30, ISBN 978-5-94285-235-1.

12. Плахтий Л. Я., Гатиева Е. И., Цховребов А. Ч. Способ исследования метаболической активности фагоцитов крови методом НСТ-теста. Патент на изобретение RU 2492484 C1, 10.09.2013.

13. Простой герпес (ПГ) у взрослых. // Клинические рекомендации. Международная ассоциация специалистов в области инфекций (МАСОИ): [Электронный ресурс]. 2016, URL: <http://neovir.info/wp-content/uploads/2020/05>. (дата обращения: 01.05.2025).

14. Ащина Л. А., Баранова Н. И., Микуляк Н. И., Журавлёв Д. И. Роль нейтрофилов в патогенезе COVID-19 (обзор литературы). *Известия вузов. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2024, 1(69), 178–193, DOI: 10.21685/2072-3032-2024-1-18.

15. Aschenbrenner A. C., Mouktaroudi M., Krämer B., Oestreich M., Antonakos N., Nuesch-Germano M., et al. Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients. *Genome Med*. 2021, 13(1), 7, DOI: 10.1186/s13073-020-00823-5.

16. Ma Y., Zhang Y., Zhu L. Role of neutrophils in acute viral infection. *Immun. Inflamm. Dis*. 2021, 9(4), 1186–1196, DOI: 10.1002/iid3.500.

17. Li Y., Wang W., Yang F., Xu Y., Feng C., Zhao Y. The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun. Signal*. 2019, 17, 147, DOI: 10.1186/s12964-019-0471-y.

18. Zhang Y., Wang Q., Mackay C. R., Ng L. G., Kwok I. Neutrophil subsets and their differential roles in viral respiratory diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2022, 111(6), 1159–1173, DOI: 10.1002/JLB.1MR1221-345R.

19. Сердобинцев К. В. Система комплемента (часть 1). *Аллергология и иммунология в педиатрии*. 2016, 2(45), 41–48, DOI: 10.24411/2500-1175-2016-00013.

20. Шахиджанов С. С., Филиппова А. Е., Бутылин А. А., Атауллаханов Ф. И. Современное представление о системе комплемента. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2019, 18(3), 130–144, DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-130-144.

21. Brockman M. A., Knipe D. M. Herpes simplex virus as a tool to define the role of complement in the immune response to peripheral infection. *Vaccine*. 2008, 26(8), 194–199, DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.062.
22. Carroll M. C. Complement and humoral immunity. *Vaccine*. 2008, 26, 128–133, DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.022.
23. Вискман М. Е., Маянский А. Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия. Метод. рекомендации. М-во здравоохранения РСФСР: Казань. 1979.
24. Гржибовский А. М. Анализ количественных данных для двух независимых групп. *Экология человека*. 2008, 2, 54–61.
25. Петри А., Сэбик К. Наглядная медицинская статистика / пер. с англ. под ред. В. П. Леонова. ГЭОТАР—Медиа: Москва. 2009, 168, ISBN 978-5-9704-0914-5.

Об авторе

Виолетта Сергеевна Марченко, студентка факультета фундаментальной медицины, Челябинский государственный университет, Россия.

ORCID: 0009-0002-5856-6560

The author

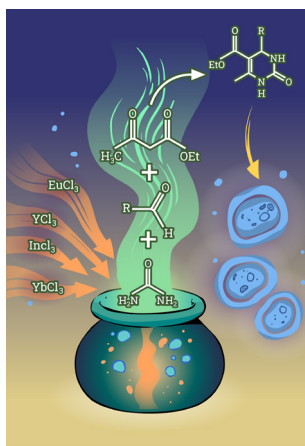
Violetta S. Marchenko, Student, Faculty of Fundamental Medicine, Specializing in Medical Biochemistry, Chelyabinsk State University, Russia.

ORCID: 0009-0002-5856-6560

Original research article

SYNTHESIS OF NEW 3,4-DIHYDROPYRIMIDIN-2(1H)-ONES: OPTIMISATION OF SYNTHESIS CONDITIONS AND ANALYSIS OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE OBTAINED COMPOUNDS

R. A. Hardunou^{1,2}, I. V. Mineyeva^{1,2*}



¹ Research Laboratory of Organoelement Synthesis,
Belarusian State University,
220030, Republic of Belarus, Minsk

² Sector of Fine Organic Synthesis,
Research Institute for Physical Chemical Problems,
220006, Republic of Belarus, Minsk

* Correspondence: i.mineyeva@yandex.ru

To cite this article:

Hardunou R. A., Mineyeva I. V. Synthesis of new 3,4-dihydropyrimidin-2(1h)-ones: optimisation of synthesis conditions and analysis of antifungal activity of the obtained compounds. *Advanced targets in Biomedicine*. 2025;1(2):89–105.
<https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-6>

Received
10.05.2025
Revised
30.06.2025
Accepted
01.09.2025
Published
08.12.2025

© Hardunou R. A., Mineyeva I. V., 2025

Abstract: This paper for the first time presents an efficient method for the synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (3,4-DHPMs) bearing aliphatic and cyclopropane-containing aldehyde residues, using europium(III) chloride hexahydrate as a catalyst in the Biginelli multicomponent reaction (MCR). A high permeability through the phospholipid bilayer and the potential for passive diffusion facilitating participation in intracellular interactions were determined. A preliminary evaluation of the antifungal properties of the obtained compounds against a range of fungal species was carried out using *in silico* methods. Experiments on the effect of 3,4-dihydropyrimidinones on the growth of *Yarrowia lipolytica* yeast showed no acute toxicity of the tested compounds within the micromolar concentration range.

Keywords: 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones, Biginelli multicomponent reaction, aliphatic and cyclopropane-containing aldehydes, europium (III) chloride, indium (III) chloride, yttrium (III) chloride, ytterbium (III) chloride, PerMM service, Pass Online service, *in silico* analysis, *Yarrowia lipolytica*



Оригинальная исследовательская статья

СИНТЕЗ НОВЫХ 3,4-ДИГИДРОПИРИМИДИН-2(1H)-ОНОВ: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА И АНАЛИЗ БИОАКТИВНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Г. А. Гордунов^{1, 2}, И. В. Минеева^{1, 2*}

¹ Научно-исследовательская лаборатория элементоорганического синтеза,

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, Республика Беларусь

² Сектор тонкого органического синтеза,
Научно-исследовательский институт
физико-химических проблем,
220006, Минск, Республика Беларусь

* Автор-корреспондент: i.mineyeva@yandex.ru

Для цитирования:

Гордунов Г. А., Минеева И. В. Синтез новых 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-онов: оптимизация условий синтеза и анализ биоактивности полученных соединений. *Современные направления в биомедицине*. 2025;1(2):89–105. <https://doi.org/10.5922/ATB-2025-1-2-6>

Поступила
10.05.2025 г.
Прошла рецензирование
30.06.2025 г.
Принята к печати
01.09.2025 г.
Опубликована
08.12.2025 г.

© Гордунов Г., Минеева И. В., 2025

Резюме: Впервые разработан эффективный метод получения 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-онов (3,4-ДГП), содержащих остаток алифатических и циклопропан содержащих альдегидов с применением гексагидрата хлорид европия(III) как катализатора для мультикомпонентной реакции (МКР) Биджинелли. Проведена комплексная оценка возможных биологических свойств полученных соединений методами *in silico*. Расчитана высокая проницаемость через фосфолипидные бислои и возможность пассивной диффузии для участия во внутриклеточных взаимодействиях. Опыты по влиянию 3,4-дигидропиримидинов на рост дрожжей *Yarrowia lipolytica* показали отсутствие острой токсичности у протестированных соединений в микромолярном диапазоне концентраций. Расчеты показывают, что 3,4-ДГП-ы могут обладать цитотоксическими свойствами относительно многих линий раковых клеток, что перспективно для биомедицинских исследований.

Ключевые слова: 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-оны, мультикомпонентная реакция Биджинелли, алифатические и циклопропансодержащие альдегиды, хлорид европия (III), хлорид индия (III), хлорид иттрия (III), хлорид иттербия (III), сервис PerMM, сервис Pass Online; анализ *in silico*, *Yarrowia lipolytica*

Introduction

Pyrimidine (1,3-diazine) derivatives have various therapeutic applications in medicinal chemistry [1]. One of the proposed reasons for the compounds' activity is the presence of a pyrimidine base in cytosine, thymine and uracil, which are essential building blocks of nucleic acids, including DNA and RNA [1].

A number of chemical compounds containing the common 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one fragment **1–3** (Fig. 1) as a core have garnered significant interest from researchers due to a wide range of therapeutic and pharmacological properties [2–4], including antitumour [5; 6] and antitubercular activity [7–9].

3,4-DHPMs can be synthesised via the Biginelli MCR, a powerful tool with a focus on generating diverse structural fragments [3; 4; 10; 11].

The use of multicomponent reactions provides a viable synthetic approach, offering several advantages: selectivity, efficient substrate utilisation, environmental friendliness, cost-effectiveness and experimental simplicity [3; 4; 10; 11]. The Biginelli reaction is unique and promising in that it provides compounds with a distinct set of cycles and functional groups [3; 4; 10; 11].

Aliphatic aldehydes typically give very low yields in the Biginelli reaction [12]. Despite the limited availability of 3,4-DHPMs bearing aliphatic aldehyde residues, considerable data exist on these compounds and their biological activities (Fig. 1) [13–16].

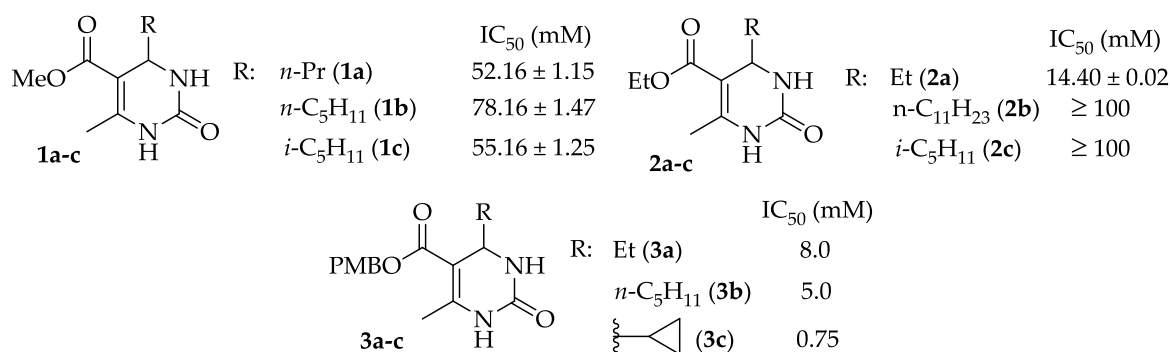


Fig. 1. Bioactive 3,4-DHPs 1-4 with an aliphatic aldehyde fragment in the side chain

Indeed, compounds **1a-c** are effective inhibitors of the enzyme β -glucuronidase, useful in combating a variety of pathological conditions [13]. Compound **2a** exhibits inhibitory activity against xanthine oxidase, an enzyme that is an important pharmacological target for the treatment of hyperuricemia in gout and arthritis [14], whereas compounds **2b,c** (Fig. 1) are potent and selective inhibitors of Punta Toro virus, *Bunyaviridae* group and *Phlebovirus* genus, and Rift Valley fever virus, comparable to ribavirin [15]. Compounds **3a-c** (Fig. 1) are sodium iodide symporter (NIS) inhibitors and radioprotective molecules capable of blocking the uptake of radioactive iodine [16].

Cyclopropane derivatives are bioactive compounds found in animals, plants and microorganisms; generated during both primary and secondary metabolism, they display diverse biological properties [17–20].

Hybrid and multifunctional drugs attract considerable attention because they combine two pharmacophore moieties within a single molecule, prompting a continual search for new 3,4-DHPMs capable of modulating known processes or revealing novel bioactivities – a practice now well established in organic synthesis [21].

To implement this idea, potential modifications of the standard Biginelli reaction product **5** (Fig. 2) were planned, taking into account the substitution of aldehyde **6** with an aliphatic aldehyde residue **7**, including those containing a cyclopropane fragment **8–11**.

Thus, compounds prepared via the Biginelli reaction using aliphatic aldehydes 7–11 [22] may exhibit distinct biological properties, as they incorporate two pharmacophore groups: the 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one ring and a cyclopropane moiety (Fig. 2).

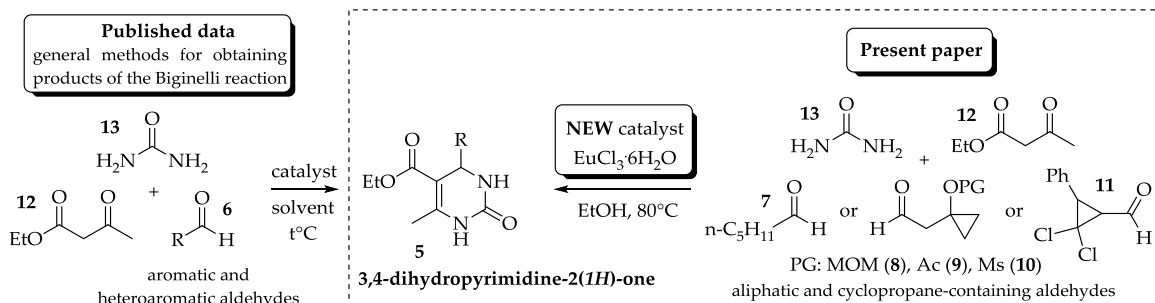


Fig. 2. Strategy for the synthesis of 3,4-DHPMs using Biginelli MCRs

Aldehydes 8–11 are labile compounds because they contain a cyclopropane ring, which can be easily opened in strongly acidic media or in the presence of strong Lewis acids; they also undergo elimination reactions in basic media. The *gem*-dihalogenocyclopropane moieties are labile under the action of basic reagents and many nucleophiles. These factors significantly limit the choice of catalysts and solvents for Biginelli MCRs involving aliphatic aldehydes 8–11.

This study aims to identify new mild and selective catalysts and conditions for the Biginelli reaction, enabling the efficient use of aliphatic aldehydes 7–11 of various structures to achieve high yields, as well as to evaluate the antifungal properties of the resulting compounds against ascomycetous yeast of the *Yarrowia lipolytica* species, including through *in silico* approaches. Such studies have not been conducted previously, as evidenced by the lack of relevant information in the literature. To accomplish this, a series of experiments was conducted to identify catalysts — rare-earth metal chlorides — that possess sufficient Lewis acidity to accelerate the reaction without disrupting the small cyclic fragment. The central idea is that these compounds should readily undergo cyclopropane ring opening under the action of various enzymatic systems, thereby laying groundwork for bioconjugation by activating them without chemical intervention in the biosphere. For example, in an organism, compound 16 is likely to undergo transfer of the acyl moiety under the influence of an acetyl-CoA molecule, potentially leading to the formation of an open-chain cyclopropanol moiety, which is known to be highly reactive toward numerous nucleophiles, electrophiles and radicals present in the system.

Materials and methods

The reagents and solvents used in this study were of 'pure' and 'pure for analysis' grade. Solvents were purified and dried according to established literature methods. The identity of the synthesised compounds was confirmed and reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on Sorbfil plates. Solvent mixtures of petroleum ether and ethyl acetate in various ratios were used as eluents. Individual compounds were isolated by column chromatography on silica gel (70–230 mesh, Merck) using the same solvent mixtures as eluents.

^1H and ^{13}C NMR spectra of 5 % solutions of the studied compounds in CDCl_3 or $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ were obtained on a Bruker Avanse-500 spectrometer (operating frequencies 500 and 125 MHz). Chemical shifts were recorded on the δ scale, using the residual proton signals of CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm for ^1H and 77.0 ppm for ^{13}C) and $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$

($\delta = 2.50$ ppm for ^1H and 39.4 ppm for ^{13}C) as references. IR spectra of the investigated substances were recorded in film on a Vertex 70, Bruker FT-IR Alpha spectrophotometer. Mass spectra were recorded on an Agilent 8860 GS system mass spectrometer using 70 eV electron impact ionisation, an Agilent 1990 1s-433e column and an HP-5 MS column over a temperature range of -60 to 350 °C. The melting point was determined on a Stuart SMP 50 Cole-Parmer instrument. The masses of the substances were measured using Radwag AS 220/C/2/N analytical balance with an accuracy of 0.1 mg.

The yeast strain *Yarrowia lipolytica* DE5.54-1 from the collection of the A. N. Bach Institute of Biochemistry of the Russian Academy of Sciences was used in the study, with its subsequent cultivation at the Laboratory of Pharmaceutical Biochemistry at the Research Institute for Physical Chemical Problems of Belarusian State University. *Yarrowia lipolytica* expresses CYP11A1 and CYP17A1 genes from bovine adrenal glands using isocitrate lyase as a promoter. Yeast cultures were grown in standard YPD nutrient medium (1 % yeast autolysate, 2 % peptone, 2 % glucose; Difco, USA) at 30 °C with mechanical agitation at 200 rpm for 24 h. After 24 h, the culture was transferred to a fresh portion of nutrient medium [23].

Microbiological experiments to evaluate the effect of the compounds on yeast growth were conducted at 30 °C and 200 rpm $\times$ min $^{-1}$ in a UHTM shaker-incubator (Elion, Russia) using YPD 0.4 nutrient medium (1 % yeast extract, 2 % peptone, 0.4 % glucose). The number of cells was estimated by absorbance at 600 nm (A_{600} , $A_{600} = 1$ correlated with 24×10^6 cells [24]). The tested compounds were added as ethanol solution to a concentration of 100 μM and 1 % ethanol. 1 % ethanol was added to the control sample. The initial number of cells corresponded to an optical density of $A_{600} = 0.5$. The cultures were incubated for 24 h. For A_{600} growth control, aliquots of 100 μl were determined by mixing 100 μl with 900 μl of growth medium at 0 , 3 , 6 , 18 and 24 h.

The general procedure for the synthesis of Biginelli products **14**–**18** was as follows: in a solution of 0.100 g (1.0 mmol) hexanal **7**, or 0.144 g (1.0 mmol) aldehyde **8**, or 0.142 g (1.0 mmol) aldehyde **9**, or 0.178 g (1.0 mmol) aldehyde **10**, or 0.215 g (1.0 mmol) aldehyde **11**, 0.130 g (1.0 mmol) acetoacetic ester **12**, 0.072 g (1.2 mmol) urea **13** with a selected catalyst in EtOH (3 mL) [15.2 mg (0.05 mmol), or 30.4 mg (0.15 mmol) $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11.0 mg (0.05 mmol), or 33.1 mg (0.15 mmol) $\text{InCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 18.3 mg (0.05 mmol), or 55.0 mg (0.15 mmol) $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 19.4 mg (0.05 mmol), or 58.1 mg (0.15 mmol) $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] was boiled for 4 – 12 h until the reaction was complete (controlled by TLC). The mixture was cooled, the precipitate was separated and recrystallised from EtO H. If no crystals formed, the solvent was removed under reduced pressure, and the product was separated by column chromatography using a petroleum ether/ethyl acetate mixture in varying proportions as the eluent.

Results

1. Selection of optimal conditions

Initially, experiments were carried out to select optimal conditions for the Biginelli reaction using hexanal **7**, acetoacetic ester **12** and urea **13** (Fig. 3).

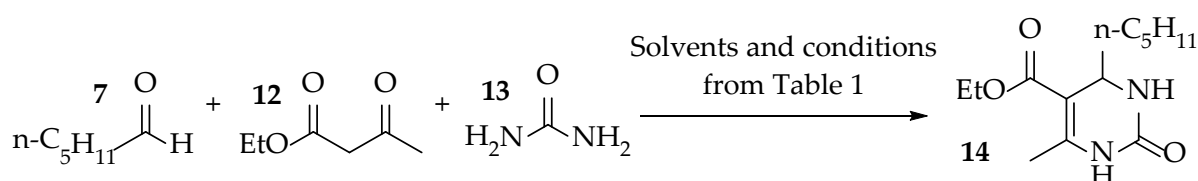


Fig. 3. Model Biginelli MCR involving hexanal **7**, acetoacetic ester **12** and urea **13**

Hexanal was chosen because 3,4-DHPMs containing pentyl fragments (**1b**, **1c**, **2c** and **3b**) are known to exhibit promising biological properties for biomedical research (see Fig. 1).

The experiments explored both established systems for aliphatic aldehydes employing a wide range of soft catalysts [12, 25–45] and newly developed systems based on rare-earth metal salts and ionic liquids (Table 1). The results of the experiments are summarised in Table 1.

Table 1

Results of Biginelli MCR experiments involving hexanal 7, acetoacetic ester 12 and urea 13 under the action of different catalysts¹

№	Catalyst (mmol)	Ratio of reagents 7/12/13	Solvent	t, °C	τ, h ²	Yield 14, % ³
1	2	3	4	5	6	7
1	TsOH (0.15) [25]	1/1.2/1.5	EtOH	80	2.5	—
2	I ₂ (0.50) [26]	1/1/1.5	PhMe	105	5	10
3	I ₂ (0.40) [27]	1/1/1.25	MeCN	82	9	—
4	TEBA (0.10) [28]	1/1/1.5	—	100	3	31
5	NH ₄ Cl (0.40) [29]	1/1/1.5	—	100	3	8
6	NaIO ₄ (0.20) [30]	1/1/2	—	20	6	14
7	NaIO ₄ (0.20) [30]	1/1/2	EtOH	80	7	6
8	LiClO ₄ (0.20) [31]	1/1/2	MeCN	82	7	72
9	LiBr (2.00) [32]	1/1/1	THF	80	7	—
10	LiBr (0.10) [33]	1/1.2/1.2	MeCN	82	7	16
11	CuI (0.15) [34]	1/1/1.5	MeCN	90	3	22
12	CuI (0.15)	1/1/1.5	EtOH	80	8	12
13	Sc(OTf) ₃ (0.10) [35]	1/1/1.2	EtOH	80	16	29
14	Sc(OTf) ₃ (0.10) [36]	1/1/1.5	MeCN	82	16	33
15	Cu(OTf) ₂ (0.01) [37]	1/1/1	MeCN	82	14	16
16	Cu(OTf) ₂ (0.20) [38]	1/1/1.5	EtOH	80 ⁵⁾	12	65
17	Zn(OTf) ₂ (0.20) [39]	1/1.5/1.5	—	100	0.3	67
18	Zn(OTf) ₂ (0.20) [12]	1/1.2/1.5	EtOH	80	7	76
19	Zn(OTf) ₂ (0.15)	1/1.1/1.2	EtOH	80	8	74
20	In(OTf) ₃ (0.10) [40]	1/1.1/1.3	MeCN	90	5	11
21	In(OTf) ₃ (0.15)	1/1.1/1.2	EtOH	80	8	19
22	Yb(OTf) ₃ (0.05) [41]	1/1/1.5	—	100	1.5	62
23	Yb(OTf) ₃ (0.15)	1/1.1/1.2	EtOH	80	8	79
24	InCl ₃ · 3H ₂ O (0.05) [42]	1/1/1.2	EtOH	80	11.5	39
25	InCl ₃ · 3H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	16	76
26	LaCl ₃ · 6H ₂ O (0.05) [43]	1/1/1.2	EtOH	80	7	53
27	LaCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	7	60
28	CoCl ₂ · 6H ₂ O (0.05)	1/1/1.2	EtOH	80	10	5
29	CoCl ₂ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	10	12
30	YbCl ₃ · 6H ₂ O (0.05) [44]	1/1/1.2	EtOH	80	7	75
31	YbCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	6	89
32	YCl ₃ · 6H ₂ O (0.05)	1/1/1.2	EtOH	80	6	86
33	YCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	10	90
34	CeCl ₃ · 7H ₂ O (0.25) [45]	1/1/3	EtOH	80	5	16
35	CeCl ₃ · 7H ₂ O (1.00)	1/1/3	EtOH	80	2.5	81
36	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.05)	1/1/1.2	EtOH	80	10	50
37	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.10)	1/1/1.2	EtOH	80	9	77

The end of Table 1

No	Catalyst (mmol)	Ratio of reagents 7/12/13	Solvent	t, °C	τ, h ²	Yield 14, % ³
1	2	3	4	5	6	7
38	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	5.5	92
39	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	MeCN	82	15	18
40	Eu(OTf) ₃ (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	8	74
41	Eu(NO ₃) ₃ (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	8	77
42	Eu ₂ (CO ₃) ₃ (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	8	19
43	Eu(OAc) ₃ (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	8	10
44	Eu ₂ (SO ₄) ₃ (0.15)	1/1/1.2	EtOH	80	8	0
45	—	1/1/1.2	IL ⁴	100	1.5	74
46	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.05)	1/1/1.2	IL	100	1.5	84
47	EuCl ₃ · 6H ₂ O (0.15)	1/1/1.2	IL	100	1.5	90

Notes:

¹ The reactions were carried out for 1 mmol of starting aldehyde **7**; 3 ml of solvent was used; the ratio of reagents and the amount of catalyst are given in Table 1.

² Time required for complete conversion of the aldehyde in the reaction.

³ Yield of the reaction product after isolation from the reaction mixture.

⁴ 1 ml of Ost(imid)BF₄ ionic liquid (IL) was applied, and the product was precipitated in water.

The involvement of aliphatic aldehydes in these transformations was significant (experiments 1–44, Table 1), as was the assessment of the effects of catalyst and ionic liquid additions, which had not been previously investigated (experiments 45–47, Table 1).

2. Synthesis of cyclopropane-containing 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones

The obtained optimal reaction conditions were transferred to aldehydes **8–11** containing the cyclopropanol moiety (Fig. 4) and new 3,4-DHPMs **15–18** were thus obtained in moderate yields (Table 2).

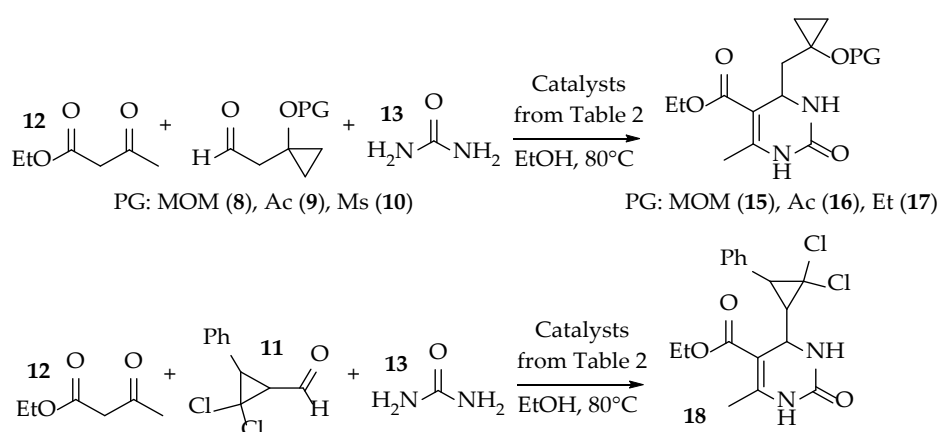


Fig. 4. Biginelli reaction involving cyclopropane-containing aldehydes **8–11**, acetoacetic ester **12** and urea **13**

Table 2

Biginelli reaction involving aldehydes 8–11, acetoacetic ester 12 and urea 13^{1,2}

Catalyst	Yield of target products depending on the amount of catalyst, % ³					
	0.05 mmol		0.15 mmol			
	15	16	15	16	17	18
YCl ₃ ·6H ₂ O	53	23	62	—	—	45
InCl ₃ ·6H ₂ O	15	27	— ⁴	—	—	—
EuCl ₃ ·6H ₂ O	5	30	10	43	51	55
YbCl ₃ ·6H ₂ O	24	19	—	—	—	47

Notes:

¹ Reaction completion time: 4–8 hours (monitored by TLC).

² The reactions were carried out using 1 mmol of starting aldehyde 8–11, 1 mmol of acetoacetic ester **12**, 1.2 mmol of urea **13** in 3 mL of ethanol at 80 °C and a selected amount of catalyst.

³ The yield of the reaction product after chromatographic separation.

⁴ The experiment was not conducted.

3. Physicochemical characteristics of the obtained compounds

Ethyl-6-methyl-2-oxo-4-pentyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**14**). M. p. = 148–150 °C. IR, ν/cm^{-1} : 3303, 3247, 1648, 1593, 1224, 1084. ¹H NMR (CDCl₃), δ/ppm : 8.20 (s, 1H, NHC=); 5.92 (s, 1H, CHNH); 4.34 (d. t, 1H, CH₂CHNH, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 3.7$ Hz); 4.22 (m, 2H, CH₃CH₂O); 2.32 (s, 3H, CH₃C=); 1.67–1.51 (m, 2H, CHCH₂); 1.48–1.29 (m, 9H, CH₂(CH₂)₃CH₃, CH₃CH₂O); 0.92 (t, 3H, CH₃(CH₂)₄, $J = 6.7$ Hz). ¹³C NMR (CDCl₃), δ/ppm : 166.0 (OCC=), 154.6 (NCO), 146.7 (CH₃C=), 101.7 (OCC=), 60.0 (CH₃CH₂O), 51.6 (CHN), 36.9 (CHCH₂), 31.5 (C₂H₅CH₂), 24.1 (C₃H₇CH₂), 22.6 (CH₃CH₂CH₂), 18.6 (CH₃C=), 14.4 (CH₃CH₂O), 14.1 (CH₃(CH₂)₄). MS, m/z (I_{rel} , %): 209 (4.2), 184 (10.1), 183 (100.0), 155 (39.6), 137 (35.4), 110 (4.2), 96 (4.2).

Ethyl-4-((1-(methoxymethoxy)cyclopropyl)methyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**15**). M. p. = 170–172 °C. IR, ν/cm^{-1} : 3236, 3110, 1697, 1648, 1225, 1085, 1037. ¹H NMR (CDCl₃), δ/ppm : 8.68 (s, 1H, NHC=); 5.93 (br. s, 1H, CHNH); 4.80–4.72 (m, 2H, CH₃OCH₂); 4.68 (d. t, 1H, CH₃CHNH, $J_1 = 10.4$, $J_2 = 3.0$ Hz); 4.20 (d. q, 2H, CH₃CH₂O, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz); 3.40 (s, 3H, CH₃OCH₂); 2.30 (s, 3H, CH₃C=); 1.95 (m, 1H, CHCH₂); 1.67 (m, 1H, CHCH₂); 1.31 (t, 3H, CH₃CH₂O, $J = 7.1$ Hz); 1.03 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 11.6$, $J_2 = 6.0$ Hz); 0.91 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 11.3$, $J_2 = 5.9$ Hz); 0.60 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 10.1$, $J_2 = 5.9$ Hz); 0.52–0.38 (m, 1H, C(CH₂)₂). ¹³C NMR (CDCl₃), δ/ppm : 165.9 (OCC=), 154.6 (NCO), 147.6 (CH₃C=), 101.2 (OCC=), 95.3 (CH₃OCH₂), 60.1 (CH₃CH₂O), 58.9 (CH₃OCH₂), 56.3 (C(CH₂)₂), 50.3 (CHCH₂), 41.6 (CHCH₂), 18.7 (CH₃C=), 14.5 (CH₃CH₂O), 13.3 (C(CH₂)₂), 10.2 (C(CH₂)₂).

Ethyl-4-((1-acetoxycyclopropyl)methyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16**). M. p. = 175–177 °C. IR, ν/cm^{-1} : 3232, 3107, 1745, 1698, 1651, 1481, 1465, 1228. 1211, 1090, 1029. ¹H NMR, δ/ppm : 8.41 (s, 1H, NHC=); 6.14–5.99 (m, 1H, CHNH); 4.50 (d. t, 1H, CH₂CHNH, $J_1 = 10.6$, $J_2 = 3.0$ Hz); 4.20 (d. q, 2H, CH₃CH₂O, $J_1 = 7.1$, $J_2 = 5.0$ Hz); 2.31 (s, 3H, CH₃C=); 2.28–2.19 (m, 1H, CHCH₂); 2.07 (s, 3H, CH₃CO); 1.73–1.58 (m, 1H, CHCH₂); 1.32 (t, 3H, CH₃CH₂O, $J = 7.1$ Hz); 1.07 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 10.8$, $J_2 = 6.9$ Hz); 0.97 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 10.2$, $J_2 = 6.8$ Hz); 0.87 (d. t, 1H, C(CH₂)₂, $J_1 = 11.2$, $J_2 = 6.6$ Hz); 0.68–0.55 (m, C(CH₂)₂, 1H). ¹³C NMR, δ/ppm : 171.5 (CH₃CO), 165.6 (OCC=), 154.3 (NCO), 147.8 (CH₃C=), 100.9 (OCC=),

60.0 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 56.9 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 49.8 (CHN), 41.3 (CHCH_2), 21.3 (CH_3CO), 18.5 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 14.3 (CH_3CH_2), 13.3 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 10.4 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$). MS, m/z (I_{rel} , %): 278 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O}$]⁺ (3.2), 253 (15.4), 252 (100.0), 224 (30.7), 196 (33.5), 179 (4.9), 178 (6.2), 150 (8.2), 106 (5.1).

Ethyl-4-((1-ethoxycyclopropyl)methyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetra-hydropyrimidine-5-carboxylate (17). M. p. = 165–167 °C. IR, ν/cm^{-1} : 3254, 3109, 1699, 1647, 1229, 1087. ¹H NMR, δ/ppm : 8.45 (s, 1H, $\text{NHC}=\text{}$); 5.80 (s, 1H, CHNH); 4.65 (d. t, 1H, CH_2CHNH , $J_1=7.7$, $J_2=3.6$ Hz); 4.21 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$); 3.64–3.45 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_2)_2$); 2.32 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 1.84–1.74 (m, 2H, CHCH_2); 1.32 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_2)_2$, $J=7.1$ Hz); 1.22 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$, $J=7.0$ Hz); 0.90 (d. t, 1H, $\text{C}(\text{CH}_2)_2$, $J_1=11.2$, $J_2=5.8$ Hz); 0.80 (d. t, 1H, $\text{C}(\text{CH}_2)_2$, $J_1=11.0$, $J_2=5.6$ Hz); 0.56 (d. d. d, 1H, $\text{C}(\text{CH}_2)_2$, $J_1=9.9$, $J_2=6.3$, $J_3=5.1$ Hz); 0.42 (d. d. d, 1H, $\text{C}(\text{CH}_2)_2$, $J_1=10.0$, $J_2=6.5$, $J_3=5.0$ Hz). ¹³C NMR, δ/ppm : 165.8 ($\text{OCC}=\text{}$), 154.3 (NCO), 147.6 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 100.9 ($\text{OCC}=\text{}$), 61.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), 59.9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_2)_2$), 59.3 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 50.6 (CHCH_2), 39.2 (CHCH_2), 18.6 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 15.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_2)_2$), 14.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), 13.8 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$), 10.5 ($\text{C}(\text{CH}_2)_2$). MS, m/z (I_{rel} , %): 184 (10.3), 183 (100.0) [$\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$]⁺, 155 (40.3), 137 (36.4), 110 (4.3), 96 (4.5), 71 (5.3).

Ethyl-4-(2,2-dichloro-3-phenylcyclopropyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (18). M. p. = 172–174 °C. IR, ν/cm^{-1} : 3223, 3099, 1693, 1642, 1220, 1086. ¹H NMR, δ/ppm : 9.37 (s, 1H, $\text{NHC}=\text{}$); 9.31 (s, 1H, $\text{NHC}=\text{}$); 7.79 (br. s, 1H, CHNH), 7.58 (br. s, 1H, CHNH); 7.41–7.08 (m, 10H, C_6H_5); 4.21 (d. d, 1H, CHNH , $J_1=8.9$, $J_2=4.2$ Hz); 4.16 (d. d, 1H, CHNH , $J_1=6.8$, $J_2=3.4$ Hz); 4.14–4.05 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 4.05–3.88 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$); 3.02 (d, 1H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}$, $J=9.0$ Hz); 2.90 (d, 1H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}$, $J=8.5$ Hz); 2.29 (t, 1H, CHCHNH , $J=8.7$ Hz); 2.23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 2.21 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{}$); 1.22 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J=7.1$ Hz); 1.07 (t, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $J=7.1$ Hz). ¹³C NMR, δ/ppm : 165.5 ($\text{OCC}=\text{}$), 165.3 ($\text{OCC}=\text{}$), 155.3 (NCO), 154.8 (NCO), 148.6 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 147.7 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 134.2 ($\text{C}(1)_{\text{Ph}}$), 133.8 ($\text{C}(1)_{\text{Ph}}$), 128.8 ($\text{C}(2)_{\text{Ph}}$), 128.7 ($\text{C}(6)_{\text{Ph}}$), 128.4 ($\text{C}(3)_{\text{Ph}}$, $\text{C}(5)_{\text{Ph}}$), 127.8 ($\text{C}(4)_{\text{Ph}}$), 101.2 ($\text{OCC}=\text{}$), 99.4 ($\text{OCC}=\text{}$), 64.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 63.4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 60.5 (CCl_2), 60.4 (CCl_2), 53.1 (CHNH), 49.8 (CHNH), 41.8 (CHCHNH), 40.9 (CHCHNH), 40.0 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}$), 37.6 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}$), 18.7 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 18.3 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{}$), 14.5 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 14.3 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$). MS, m/z (I_{rel} , %): 323 (1.8), 259 (1.8), 183 (100), 155 (28.4), 155 (40.3), 149 (8.3), 137 (20.1), 127 (1.2), 115 (9.4), 96 (2.5), 89 (1.9), 77 (1.2).

4. In silico prediction of permeability through cell membranes

In further studies, the permeability of all newly synthesised products via passive diffusion through the phospholipid bilayer was theoretically evaluated through *in silico* 3D structure simulations using the PerMM service (Table 3) [46].

PerMM calculates the membrane binding energies (ΔG_{bind}) and the transfer energy profiles ($\Delta G_{\text{transf}}(z)$) of permeants in membranes and obtains their optimal spatial positions and conformations during rotational and translational motion along the membrane normal z [46]. The membrane-bound state of a permeant is defined as its conformation and the spatial position in the membrane with the lowest transfer energy from water [46]. Integrating the free energy profile along the permeation pathway allows the evaluation of permeability coefficients (P) of molecules through artificial and natural membranes [46].

3D coordinates for molecules were generated using molecular Chem3D modeling software (PerkinElmer Informatics, Inc.) with subsequent local energy minimisation. To calculate the lowest transfer energy pathway of a molecule along the membrane normal, the drag method was employed, in which energy transfer is locally minimised with respect to the rotational variables of the molecule at each $z + \Delta z$ point along the transmembrane pathway, starting from the optimal rotational orientation

determined at the preceding point z . The modelling conditions were as follows: pH = 7.35, T = 37 °C; cholesterol and glucose were chosen as reference standards for comparison.

Table 3

Values of logP and free energy of binding by the Biginelli MCR product for different types of membranes

Number of compound	Free energy of binding, kcal/mol	Logarithm of the permeability coefficient (logP)			
		BLM ¹	BBB ²	Caco-2 ³	PAMPA DS ⁴
14	– 3.70	– 1.30	– 3.35	– 3.81	– 2.43
15	– 2.88	– 2.70	– 3.85	– 4.17	– 3.72
16	– 3.85	– 1.32	– 3.36	– 3.82	– 2.45
17	– 4.39	– 0.23	– 2.98	– 3.54	– 1.44
18	– 4.69	– 1.22	– 3.32	– 3.79	– 2.35
Glucose	– 1.82	– 9.08	– 6.10	– 5.80	– 9.60
Cholesterol	– 10.25	6.08	– 0.75	– 1.92	4.39

Notes:

¹ Black lipid membrane (artificial).

² Blood-brain barrier (natural).

³ The cell membrane of human colorectal adenocarcinoma of the colon used as a model of the intestinal epithelial barrier (natural).

⁴ Double-Sink Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: the lipid solution consists of 20 % dodecane solution and a mixture of phospholipids; the acceptor solution contains a mixture of surfactants (an in vitro model of passive transcellular permeability over a large pH range).

5. In silico prediction of antifungal activity against a variety of fungi

A powerful set of methods for the computer prediction of the biological activity of chemical compounds is based on Bayesian probability. The PASS software package is capable of predicting the biological activity spectra of currently known chemical compounds [47]. The approach employed in PASS to predict the biological activity of a chemical compound rests on the assumption that Activity = Structure. The structure of a compound is, in turn, characterised by its individual functional elements (descriptors), such as radicals and functional groups of atoms [47].

Using the AntiFun Pred platform, potential cytotoxicity calculations were performed for a wide range of fungi with the obtained compounds. The results are presented in Table 4.

Table 4

Results of *in silico* prediction of antifungal activity for compounds 14–18

Number of compound	Confidence	Binomial name
14	0.2661	<i>Rhizopus oryzae</i>
	0.1552	<i>Mucor hiemalis</i>
	0.1429	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	0.0278	<i>Yarrowia lipolytica</i>

The end of Table 4

Number of compound	Confidence	Binomial name
15	0.0513	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	0.0482	<i>Pichia guilliermondii</i>
	0.0268	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	0.0132	<i>Galactomyces geotrichum</i>
16	0.1981	<i>Clavispora lusitaniae</i>
	0.0950	<i>Galactomyces geotrichum</i>
	0.0730	<i>Pichia guilliermondii</i>
	0.0704	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
17	0.1303	<i>Pichia guilliermondii</i>
	0.1179	<i>Galactomyces geotrichum</i>
	0.1143	<i>Candida dubliniensis</i>
	0.1096	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
18	0.1446	<i>Rhizopus oryzae</i>
	0.1186	<i>Absidia corymbifera</i>
	0.1051	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	0.0173	<i>Yarrowia lipolytica</i>

6. Experiments on yeast fungi of the *Yarrowia lipolytica* species

The obtained compounds, **14**–**18**, were tested for activity against *Yarrowia lipolytica* yeast, which provides a convenient model for glycolysis, apoptosis and gene expression in tumours [48–50]. The experiment demonstrated no significant suppression of culture growth at 6, 18 and 24 h of incubation (Table 5).

Table 5

Number of *Yarrowia lipolytica* yeast cells (millions, rounded to whole numbers) incubated with 100 μ M of the tested compounds

Compound number	Sampling time				
	0 h	3 h	6 h	18 h	24 h
1	2	3	4	5	6
14	12	28	58	458	814
15	12	27	59	450	816
16	12	22	55	408	818
17	12	24	57	418	836
18	12	23	60	420	804
Control	12	17	41	384	792

Discussion

In the MCR model with hexanal, europium (III) chloride proved to be the most efficient catalyst, consistently forming a well-shaped dense precipitate upon cooling, with the possibility of reusing catalyst-containing solution. High to moderate yields were obtained with ytterbium (III), yttrium (III) and indium (III) chloride hexahydrates.

As for the cyclopropane-containing aldehydes, the best results for compound **9** were also obtained using europium (III) chloride as catalyst, whereas in the case of aldehyde **8**, yttrium(III) chloride performed best, which is likely due to the partial removal of the methoxymethyl protection by europium (III) salt acting as a Lewis acid (Fig. 4, Table 2).

The involvement of aldehyde **10** in the Biginelli reaction, catalysed by europium (III) chloride and yttrium (III) chloride, resulted in the formation of an unexpected product **17**. This product arose from the elimination of methanesulfonate and the Michael addition of ethanol to the intermediate aldehyde **19**, with aldehyde **20** directly participating in the MCR (Fig. 5).

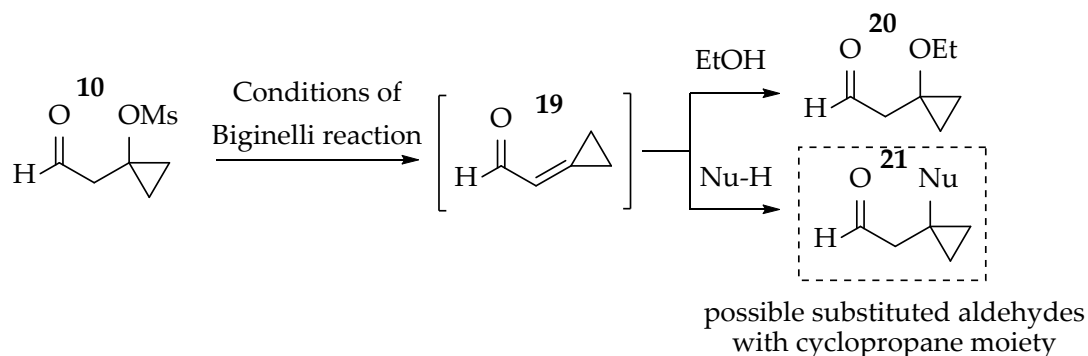


Fig. 5. Suggested scheme for the formation of aldehyde **20**

It can be assumed that, with appropriate optimisation of conditions, a similar transformation with other nucleophiles (Nu–H) will yield aldehydes of species **21**, capable of mild and selective Michael addition, thereby expanding the range of synthesised 3,4-DHPM structural species in this transformation (Fig. 5).

It can be assumed that, with an appropriate selection of optimal conditions, a similar transformation with other nucleophiles (Nu–H) will yield aldehydes of species **21**, capable of mild and selective Michael addition, thereby expanding the range of synthesised 3,4-DHPM compounds in this transformation (Fig. 5).

Data obtained from the PerMM server indicate that all studied compounds can passively penetrate model cell membranes and participate in intracellular regulatory processes, as a logarithm of the permeability coefficient (logP) greater than –4.35 suggests a compound's potential for passive transport across the cell membrane [46]. Compounds **17** and **18** exhibit the highest binding energy.

Notably, this calculation is essential, as further increases or decreases in antifungal activity can be explained by Overtone's concept of cell permeability, which suggests that the lipid membrane surrounding the cell favours the passage of only lipid-soluble materials [51]. Therefore, liposolubility is an important factor controlling antifungal activity.

Comprehensive *in silico* prediction of antifungal properties (Table 4) indicated that the studied compounds may have potential for the treatment of zygomycosis, caused primarily by micromycetes of the genus *Rhizopus* (mainly *Rhizopus oryzae*) and, less frequently, by those of the genus *Mucor* [52]. This is indicated by the high probability of activity against these fungal species for compounds **14** and **18**. At the same time, compound **16** is predicted with high confidence to possess antifungal activity against *Clavispora lusitaniae* yeast, which may have potential applications in the treatment of disseminated candidiasis, including septicaemia and pyelonephritis [53].

The *in vitro* experiment on *Yarrowia lipolytica* yeast showed that the compounds exhibited no antifungal activity against these microorganisms and no toxicity through mechanisms common to eukaryotes [54]. These findings are consistent with the earlier computational analysis, as the predicted reliability of detecting cytotoxic properties against this yeast species was extremely low. **Funding:** This research was funded by SRP, state registration number 20240340.

Funding: This research was funded by SRP, state registration number 20240340.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ государственной программы научных исследований (№ гос. регистрации 20240340).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Reference

1. Sondhi S. M., Rajendra N. G., Anand M. L., Nirupma S., Rakesh S., Ram R. Synthesis and biological evaluation of 2-thiopyrimidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3185–3195, DOI: 10.1016/j.bmc.2005.02.047.
2. Mohammadi B., Behbahani F. K. Recent developments in the synthesis and applications of dihydropyrimidin-2(1H)-ones and thiones. *Mol. Divers.* 2018, 22, 405–446, DOI: 10.1007/s11030-017-9806-z.
3. Mushtaq A., Munawar A., Parveen B., Javed S., Zahoor A. F., Ali K. G., et al. Recent advances in the synthesis of dihydropyrimidinones via Biginelli reaction. *J. Iran Chem. Soc.* 2024, 21, 2565–2586, DOI: 10.1007/s13738-024-03100-z.
4. Katariya D., Vyas A., Khunt R. Mini-reviewing the synthesis of dihydropyrimidine derivatives. *Rev. Adv. Chem.* 2025, 15, 1–6, DOI: 10.1134/S263482762460035X.
5. Dowarah J., Patel D., Marak B. N., Yadav U. C. S., Shah P. K., Shukla P. K., et al. Green synthesis, structural analysis and anticancer activity of dihydropyrimidinone derivatives. *RSC Adv.* 2021, 11, 35737–35753, DOI: 10.1039/D1RA03969E.
6. Abdul Lathiff M. K. M., Suresh R., Senthamarai R., Annadurai S., Bhandare R. R., Shaik A. B. Exploring substituted 3,4-dihydropyrimidinone and thione derivatives as anti-prostate cancer agents: Computational screening, synthesis, characterization, and in vitro efficacy assessment. *J. Saudi Chem. Soc.* 2024, 28, 101798, DOI: 10.1016/j.jscs.2023.101798.
7. Prasad B. D., Sastry V. G., Kiran G. Green chemistry protocol for the synthesis and antimycobacterial activity of multicomponent Biginelli condensation catalyzed by surfactant in aqueous media. *Pharmacologia.* 2015, 6, 300–306, DOI: 10.5567/pharmacologia.2015.300.306.
8. Venugopala K. N., Tratat C., Pillay M., Chandrashekharappa S., Al-Attaqchi O. H. A., Aldhubiab B. E., et al. *In silico* design and synthesis of tetrahydropyrimidinones and tetrahydropyrimidinethiones as potential thymidylate kinase inhibitors exerting anti-tb activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Des. Dev. Ther.* 2020, 14, 1027–1039, DOI: 10.2147/DDDT.S228381.
9. Kumar R. R., Kannappan N., Kumar K. S. Synthesis, biological evaluation of novel 6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derived chalcones as potent antitubercular agents. *J. Xi'an Shiyu Univ. Nat. Sci. Ed.* 2021, 17, 242–257.
10. Nagarajaiah H., Mukhopadhyay A., Moorthy J. N. Biginelli reaction: an overview. *Tetrahedron Lett.* 2016, 57, 5135–5149, DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.09.047.
11. Kaur R., Chaudhary S., Kumar K., Gupta M. K., Rawal R. K. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 2017, 132, 108–134, DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.025.
12. Wang M., Jiang H., Wang Z. Biginelli condensation of aliphatic aldehydes catalysed by zinc methanesulfonate. *J. Chem. Res.* 2005, 11, 691–693, DOI: 10.3184/03082340577490943.

13. Ali F., Khan K. M., Salar U., Iqbal S., Taha M., Ismail N. H., et al. Dihydropyrimidones: as novel class of β -glucuronidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2016, 24, 3624–3635, DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.002.

14. Zafar H., Iqbal S., Javaid S., Khan K. M., Choudhary M. I. Xanthine oxidase inhibitory and molecular docking studies on pyrimidones. *Med. Chem.* 2018, 14, 524–535, DOI: 10.2174/1573406413666171129224919.

15. Kumarasamy D., Roy B. G., Rocha-Pereira J., Neyts J., Nanjappan S., Maity S., et al. Synthesis and in vitro antiviral evaluation of 4-substituted 3,4-dihydropyrimidinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27, 139–142, DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.12.010.

16. Lacotte P., Puente C., Ambroise Y. Synthesis and evaluation of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as sodium iodide symporter inhibitors. *ChemMedChem.* 2013, 8, 104–111, DOI: 10.1002/cmdc.201200417.

17. Talele T. T. The “cyclopropyl fragment” is a versatile player that frequently appears in preclinical/clinical drug molecules. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 8712–8756, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00472.

18. Chawner S. J., Cases-Thomas M. J., Bull J. A. Divergent synthesis of cyclopropane-containing lead-like compounds, fragments and building blocks through a cobalt catalyzed cyclopropanation of phenyl vinyl sulfide. *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 34, 5015–5024, DOI: 10.1002/ejoc.201701030.

19. Chen D., Cheng Y., Shi L., Gao X., Huang Y., Du Z. Design, synthesis, and antimicrobial activity of amide derivatives containing cyclopropane. *Molecules.* 2024, 29, 4124–4142, DOI: 10.3390/molecules29174124.

20. Menzek A., Sirtbasi S., Sahina E., Bayrak C., Olgun M. E., Yavari A., et al. Synthesis of compounds including cyclopropane ring: Selectivity in additions. *J. Mol. Struct.* 2025, 1324, 140807, DOI: 10.1016/j.molstruc.2024.140807.

21. Bansal Y., Silakari O. Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 76, 31–42, DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.01.060.

22. Mineyeva I. V., Faletrov Y. V., Starovoytova V. A., Shkumatov V. M. New 1,4-dihydropyridines. Optimization of the synthesis and *in silico* analysis of biological activity. *Russ. J. Org. Chem.* 2022, 58, 268–281, DOI: 10.1134/S1070428022030034.

23. Faletrov Y. V., Frolova N. S., Hlushko H. V., Rudaya E. V., Edimecheva I. P., Mauersberger S., et al. Evaluation of the fluorescent probes Nile Red and 25-NBD-cholesterol as substrates for steroid-converting oxidoreductases using pure enzymes and microorganisms. *FEBS J.* 2013, 280, 3109–3119, DOI: 10.1111/febs.12265.

24. Saxena A. K., Singh A. Mycobacterial tuberculosis enzyme targets and their inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 2019, 9, 337–355, DOI: 10.2174/1568026619666190219105722.

25. Jin T., Zhang S., Li T. p-Toluenesulfonic acid-catalyzed efficient synthesis of dihydropyrimidines: improved high yielding protocol for the Biginelli reaction. *Synth. Commun.* 2002, 32, 1847–1851, DOI: 10.1081/SCC-120004068.

26. Bhosale R. S., Bhosale S. V., Bhosale S. V., Wang T., Zubaidha P. K. An efficient, high yield protocol for the one-pot synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-ones catalyzed by iodine. *Tetrahedron Lett.* 2004, 45, 9111–9113, DOI: 10.1016/j.tetlet.2004.10.021.

27. Srinivas K., Das B. Iodine catalyzed one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones and thiones: a simple and efficient procedure for the Biginelli reaction. *Synthesis.* 2004, 36, 2091–2093, DOI: 10.1055/s-2004-829170.

28. Mobinikhaledi A., Forughifar N., Alipour Safari J. A., Amini E. Synthesis of some 2-oxo and 2-thioxo substituted pyrimidines using solvent-free conditions. *J. Heterocycl. Chem.* 2007, 44, 697–699, DOI: 10.1002/jhet.5570440329.
29. Shaabani A., Bazgir A., Teimouri F. Ammonium chloride-catalyzed one-pot synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 857–859, DOI: 10.1016/S0040-4039(02)02612-6.
30. Jing X., Li Z., Pan X., Shi Y., Yan C. NaIO_4 -catalyzed one-pot synthesis of dihydropyrimidinones at room temperature under solvent-free conditions. *J. Iran Chem. Soc.* 2009, 6, 514–518, DOI: 10.1007/BF03246529.
31. Yadav J. S., Reddy B. V. S., Srinivas R., Venugopal C., Ramalingam T. LiClO_4 -catalyzed one-pot synthesis of dihydropyrimidinones: an improved protocol for Biginelli reaction. *Synthesis*. 2001, 2001, 1341–1345, DOI: 10.1055/s-2001-15229.
32. Baruah P. P., Gadhwal S., Prajapati D., Sandhu J. S. The Biginelli condensation: a novel and efficient regioselective synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-ones using lithium bromide. *Chem. Lett.* 2002, 31, 1038–1039, DOI: 10.1246/cl.2002.1038.
33. Maiti G., Kundu P., Guin C. One-pot synthesis of dihydropyrimidinones catalysed by lithium bromide: an improved procedure for the Biginelli reaction. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 2757–2758, DOI: 10.1016/S0040-4039(02)02859-9.
34. Kalita H. R., Phukan P. CuI as reusable catalyst for the Biginelli reaction. *Catal. Commun.* 2007, 8, 179–182, DOI: 10.1016/j.catcom.2006.06.004.
35. De S. K., Gibbs R. A. Scandium(III) triflate as an efficient and reusable catalyst for synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Synth. Commun.* 2005, 35, 2645–2651, DOI: 10.1080/00397910500213781.
36. Matache M., Dobrota C., Bogdan N. D., Dumitru I., Ruta L. L., Paraschivescu C. C., et al. Synthesis of fused dihydro-pyrimido[4,3-d]coumarins using Biginelli multicomponent reaction as key step. *Tetrahedron*. 2009, 65, 5949–5957, DOI: 10.1016/j.tet.2009.05.088.
37. Paraskar A. S., Dewkar G. K., Sudalai A. $\text{Cu}(\text{OTf})_2$: a reusable catalyst for high-yield synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 3305–3308, DOI: 10.1016/S0040-4039(03)00619-1.
38. Pasunooti K. K., Chai H., Jensen C. N., Gorityala B. K., Wang S., Liu X. W. A microwave-assisted, copper-catalyzed three-component synthesis of dihydropyrimidinones under mild conditions. *Tetrahedron Lett.* 2011, 52, 80–84, DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.10.150.
39. Hui X., Yan-Guang W. A rapid and efficient Biginelli reaction catalyzed by zinc triflate. *Chin. J. Chem.* 2003, 21, 327–331, DOI: 10.1002/cjoc.20030210321.
40. Godoi M. N., Costenaro H. S., Kramer E., Montes D'Oca M. G., Russowsky D. Síntese do monastrol e novos compostos de Biginelli promovida por $\text{In}(\text{OTf})_3$. *Quim. Nova*. 2005, 28, 1010–1013, DOI: 10.1590/S0100-40422005000600015.
41. Wang L., Qian C., Tian H., Ma Y. Lanthanide triflate catalyzed one-pot synthesis of dihydropyrimidin-2(1H)-thiones by a three-component of 1,3-dicarbonyl compounds, aldehydes, and thiourea using a solvent-free Biginelli condensation. *Synth. Commun.* 2003, 33, 1459–1468, DOI: 10.1081/SCC-120018755.
42. Treptow T. G. M., Figueiró F., Jandrey E. H. F., Battastini A. M. O., Salbego C. G., Hoppe J. B., et al. Novel hybrid DHPM-fatty acids: Synthesis and activity against glioma cell growth *in vitro*. *Eur. J. Med. Chem.* 2015, 95, 552–562, DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.03.062.

43. Phan N. H. T., Kim H., Shin H., Lee H.-S., Sohn J.-H. Dehydrosulfurative C—N cross-coupling and concomitant oxidative dehydrogenation for one-step synthesis of 2-aryl(alkyl) aminopyrimidines from 3,4-dihydropyrimidin-1*H*-2-thiones. *Org. Lett.* 2016, 18, 5154—5157, DOI: 10.1021/acs.orglett.6b02617.
44. Zhang H., Zhou Z., Yao Z. Efficient synthesis of pyrimidinone derivatives by ytterbium chloride catalyzed Biginelli-type reaction under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 1622—1624, DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.01.103.
45. Bose D. S., Fatima L., Mereyala H. B. Green chemistry approaches to the synthesis of 5-alkoxycarbonyl-4-aryl-3, 4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones by a three-component coupling of one-pot condensation reaction: comparison of ethanol, water, and solvent-free conditions. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 587—590, DOI: 10.1021/jo0205199.
46. Lomize A. L., Pogozheva I. D., Mosberg H. I. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *J. Chem. Inf. Model.* 2011, 51, 930—946, DOI: 10.1021/ci200020k.
47. Filimonov D. A., Lagunin A. A., Gloriovova T. A., Rudik A. V., Druzhilovskii D. S., Pogodin P. V., et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2014, 50, 444—457, DOI: 10.1007/s10593-014-1496-1.
48. Matuo R., Sousa F. G., Soares D. G., Bonatto D., Saffi J., Escargueil A. E., et al. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012, 70, 491—502, DOI: 10.1007/s00280-012-1937-4.
49. Pereira C., Coutinho I., Soares J., Bessa C., Leão M., Saraiva L. New insights into cancer-related proteins provided by the yeast model. *FEBS J.* 2012, 279, 697—712, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08477.x.
50. Guaragnella N., Palermo V., Galli A., Moro L., Mazzoni C., Giannattasio S. The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2. *FEMS Yeast Res.* 2014, 14, 2—16, DOI: 10.1111/1567-1364.12094.
51. Pothiraj C., Velan A. S., Joseph J., Raman N. Simple method of preparation and characterization of new antifungal active Biginelli type heterocyclic compounds. *Mycobiology.* 2008, 36, 66—69, DOI: 10.4489/MYCO.2008.36.1.066.
52. Pal M. Zygomycosis: A highly infectious emerging opportunistic fungal disease of public health concern. *J. Mycol. Mycological Sci.* 2020, 3, 1—4, DOI: 10.23880/oajmms-16000123.
53. Mendoza-Reyes D. F., Gómez-Gaviria M., Mora-Montes H. M. *Candida lusitanae*: biology, pathogenicity, virulence factors, diagnosis, and treatment. *Infect. Drug. Resist.* 2022, 15, 5121—5135, DOI: 10.2147/IDR.S383785.
54. Faletro Y. V., Gilep K. A., Falchevskaya A. S., Horetski M. S., Panada J. V., Andrievskaya E. V., et al. *In silico* modeling of izoniazid-steroid conjugates interactions with cytochromes P450 of mycobacteria and their bioconversion *in vitro* by the cells. *Biomed. Khim.* 2020, 66, 378—385, DOI: 10.18097/PBMC20206605378.

Об авторах

Григорий Александрович Гордунов, ассистент кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета, магистрант кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета, стажер младшего научного сотрудника сектора тонкого органического синтеза учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Республика Беларусь.

ORCID: 0009-0007-5741-8386

Ирина Владимировна Минеева, доцент, доктор химических наук, профессор кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета, заведующий сектором тонкого органического синтеза учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Республика Беларусь.

ORCID: 0000-0002-6422-1967

The authors

Ryhor. A. Hardunou, Assistant of the Department of Organic Chemistry of the Faculty of Chemistry of the Belarusian State University, Master's student of the Department of Organic Chemistry of the Faculty of Chemistry of the Belarusian State University, intern of a junior research fellow of the fine organic synthesis sector of the Belarusian State University «Research Institute for Physical Chemical Problems», Republic of Belarus.

ORCID: 0009-0007-5741-8386

Iryna V. Mineyeva, Associate Professor, Doctor of Chemical Sciences, Professor of the Department of Organic Chemistry of the Faculty of Chemistry of the Belarusian State University, Head of the Fine Organic Synthesis Sector of the Belarusian State University «Research Institute for Physical Chemical Problems», Republic of Belarus.

ORCID: 0000-0002-6422-1967

СОВРЕМЕННЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ
В БИОМЕДИЦИНЕ

2025 • $\frac{\text{Том}}{\text{Vol.}}$ 1 • № 2

ADVANCED TARGETS
IN BIOMEDICINE

Научное электронное издание

Редактор *Е. Т. Иванова*
Компьютерная верстка *Е. В. Денисенко*

Дата выхода в свет 08.12.2025 г.
Формат 60×90 1/8. Усл. печ. л. 13,3

