

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Багирова Н.С.¹, Григорьевская З.В.¹, Терещенко И.В.¹, Петухова И.Н.¹, Казимов А.Э.¹, Винникова В.Д.²,
Вершинская В.А.²

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНАЭРОБНОГО КОМПОНЕНТА МИКРОБИОТЫ ПОЛОСТИ РТА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522,
Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО МГМСУ им А. И. Евдокимова Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

*Цель исследования – изучить ткани опухоли первичных и повторных пациентов с раком орофарингеальной области на предмет частоты встречаемости четырех видов анаэробных пародонтогенов (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*) и их ассоциаций культуральным методом и ПЦР- real time. Проведена сравнительная оценка содержания 4-х анаэробных пародонтогенов в опухолевой ткани и в здоровой ткани слизистой оболочки полости рта больных раком орофарингеальной области. Установлено, что идентификация пародонтогенов методом ПЦР-РВ более информативна по сравнению с культуральным методом, за исключением *P. intermedia*, для идентификации которой культуральный метод оказался более результативным. У 33,3% пациентов, как первичных, так и повторных, спектр микроорганизмов одинаков и в здоровой, и в опухолевой ткани. У 20% первичных и у 13,3% повторных пациентов в здоровой ткани не выявлено ассоциаций микроорганизмов, включенных в исследование. Ассоциации из 4-х бактерий регистрировались только в опухолевой ткани и у первичных, и у повторных пациентов, у повторных – статистически значимо чаще. У 53,3% повторных пациентов в опухолевой ткани регистрировались ассоциации из 4-х бактерий, тогда как у первичных пациентов – только в одном случае. *P. gingivalis* из опухолевой ткани у повторных пациентов выделялась статистически значимо чаще, нежели у первичных пациентов. *T. forsythensis* у первичных пациентов в здоровых тканях выявлялась статистически значимо чаще, нежели у повторных, у которых из опухолевой ткани *T. forsythensis* была выделена статистически значимо чаще, чем в здоровой ткани. *T. denticola* в здоровой ткани выявлена как у первичных, так и у повторных пациентов в единичных случаях. *T. denticola* в опухолевой ткани выявлялась статистически значимо чаще по сравнению со здоровой, причем как у первичных, так и у повторных пациентов. *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, возможно, следует считать индикаторами риска, указывающими на уровень значимости их ассоциаций с раком орофарингеальной области.*

Ключевые слова: рак орофарингеальной области; пародонтопатогены; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella intermedia*; *Tannerella forsythensis*; *Treponema denticola*.

Для цитирования: Багирова Н.С., Григорьевская З.В., Терещенко И.В., Петухова И.Н., Казимов А.Э., Винникова В.Д., Вершинская В.А. Микробиологическая и молекулярная идентификация анаэробного компонента микробиоты полости рта у больных раком орофарингеальной области. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 301-308.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-301-308>

Для корреспонденции: Багирова Наталья Сергеевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. микробиологии; e-mail: nbagirova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках НИР по теме АААА-А20-120031090079-6.

Благодарность. Авторы выражают благодарность коллективу и зав. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза Смирновой К.В. за возможность использовать результаты обработки проб методом ПЦР-real time.

Поступила 28.10.2021

Принята к печати 28.12.2021

Опубликовано 21.05.2022

Bagirova N.S.¹, Grigorievskaya Z.V.¹, Tereshchenko I.V.¹, Petukhova I.N.¹, Kazimov A.E.¹, Vinnikova V.D.², Verzhinskaya V.A.²

MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF THE ANAEROBIC COMPONENT OF THE ORAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH CANCER OF THE OROPHARYNGEAL REGION

¹N. N. Blokhin national medical research center of oncology, 115522, Moscow, Russia;

²A. I. Evdokimov Moscow state university of medicine and dentistry, 127473, Moscow, Russia

*A research objective – to study tumor tissues of primary and recurrent patients with cancer of the oropharyngeal region for the frequency of occurrence of four types of anaerobic periodontogens and their associations by two methods: real-time PCR and cultural. There is speculation that bacteria can influence the pathogenesis of cancer. A comparative assessment of the content of four anaerobic periodontogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*) in the tumor tissue and in the healthy tissue of the oral mucosa of patients with oropharyngeal cancer was carried out. It was found that the identification of odontopathogens by the real-time PCR method is much more informative than the traditional culture method, with the exception of *P. intermedia*, for the identification of which the traditional culture method was more effective. In 33.3% of patients, both primary and secondary, the composition of microorganisms was the same in both healthy and tumor tissue. In 20% of primary patients and in 13.3% of repeat patients, no associations of microorganisms included in the study were found in healthy tissue. Associations of 4 bacteria were recorded only in tumor tissue in both primary and repeated patients, and in repeated patients – statistically significantly more often. In 53.3% of repeat patients, associations of 4 bacteria were recorded in tumor tissue, whereas in primary patients, only in one case. *P. gingivalis* from tumor tissue in repeat patients was statistically*

significantly more often than in primary patients. *T. forsythensis* in primary patients was found statistically significantly more often in healthy tissues than in repeat patients, in which *T. forsythensis* was found statistically significantly more often from tumor tissue than in healthy tissue). *T. denticola* in healthy tissue was detected in both primary and repeated patients in isolated cases. *T. denticola* in tumor tissue was found statistically significantly more frequently in both primary and repeated patients compared to healthy tissue. *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, and *T. denticola* should perhaps be considered risk indicators indicating the level of significance of their associations with oropharyngeal cancer.

Key words: oropharyngeal cancer; periodontopathogens; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella intermedia*; *Tannerella forsythensis*; *Treponema denticola*.

For citation: Bagirova N.S., Grigorievskaya Z.V., Tereshchenko I.V., Petukhova I.N., Kazimov A.E., Vinnikova V.D., Vershinskaya V.A. Microbiological and molecular identification of the anaerobic component of the oral microbiota in patients with cancer of the oropharyngeal region. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 301-308 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-301-308>

For correspondence: Bagirova Nataliya Sergeevna, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher of the Microbiological Laboratory; e-mail: nbagirova@mail.ru

Information about authors:

Bagirova N.S., <https://orcid.org/0000-0003-1405-3536>;
Grigorievskaya Z.V., <https://orcid.org/0000-0003-4294-1995>;
Tereshchenko I.V., <https://orcid.org/0000-0002-5052-7391>;
Petukhova I.N., <https://orcid.org/0000-0003-3077-0447>;
Kazimov A.E., <https://orcid.org/0000-0002-7117-9453>;
Vinnikova V.D., <https://orcid.org/0000-0002-7508-0338>;
Vershinskaya V.A., <https://orcid.org/0000-0003-3893-9200>.

Funding. The study was done with the financial support of the Ministry of Health of the Russian Federation within the framework of the research work on the topic AAAA-A20-120031090079-6.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflicts of interest.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the employees of the laboratory of viral carcinogenesis, Research Institute of Carcinogenesis, headed by the head of Smirnova K. V. for processing samples by the PCR-real time method.

Received 28.10.2021
Accepted 28.12.2021
Published 21.05.2022

Введение. В последние годы появились новые данные в области эпидемиологии онкологических заболеваний: зарегистрирован рост злокачественных новообразований головы и шеи во всем мире, несмотря на современные значительные достижения медицины. Плоскоклеточный рак слизистых оболочек орофарингеальной области – наиболее распространенный гистологический подтип. Это и биологически, и клинически гетерогенное заболевание с различными факторами риска, реакцией на лечение и прогнозами [1 – 3].

В настоящее время ученые придерживаются единого мнения о том, что дисбиоз полости рта имеет взаимосвязи с различными системными расстройствами [4, 5]. Существует гипотеза, предполагающая связь развития рака орофарингеальной области с дисбиозом полости рта. Опухоли слизистой оболочки напрямую контактируют с бактериями и поэтому подвержены влиянию микробиоты и её микробиома. Опухолевая ткань может иметь свой особый микробиом вследствие пенетрации бактерий в некротическую среду опухоли из смежных областей, удалённых полостей слизистой оболочки или каких-либо ещё локусов, влияя на функции клеток ткани, что может быть связано с изменением иммунного реагирования организма. Пока нет ясности, является ли присутствие этих бактерий причиной или только следствием влияния опухоли на функции ткани. Активное изучение процесса канцерогенеза с привлечением всех современных возможностей изучения микробиоты и её микробиома неизбежно должно привести к более глубокому пониманию происходящих процессов. Уже получено значительное количество подтверждений тому, что микробиота полости рта композиционно и функционально связана с мутационными изменениями при раке

полости рта [6]. Полагают, что это происходит в результате повреждения слизистой оболочки, гиперпролиферации эпителиальных клеток и воспаления [7, 8].

Предполагают три механизма действия микробиоты полости рта в патогенезе рака [9]. Первый – бактериальная стимуляция хронического воспаления. Медиаторы воспаления, продуцируемые в этом процессе, вызывают или способствуют пролиферации клеток, мутагенезу, активации онкогенов и ангиогенезу. Второй механизм: бактерии могут влиять на патогенез рака, влияя на пролиферацию клеток, перестройку цитоскелета, активацию фактора NF-κB и ингибирование клеточного апоптоза. Третий механизм: бактерии производят канцерогенные вещества.

Существует прямая взаимосвязь между микробиомом полости рта, метаболизмом организма человека и местным иммунитетом. Выявлены выраженные различия состава микробиоты полости рта у больных раком орофарингеальной зоны и у здоровых лиц [10].

Не до конца ясно, являются ли наблюдаемые изменения в микробиоте опухолевой ткани вторичными в ответ на канцерогенез, либо эти изменения есть следствие их интеграции в процесс патогенеза, как фактора риска развития опухоли орофарингеальной области [7].

Микробиота полости рта многообразна, и некоторые виды бактерий и их ассоциаций связаны, по данным отечественных и зарубежных авторов, с выраженной деструкцией тканей пародонта: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis* [11-13]. Определённые комбинации бактерий признаны лучшими индикаторами заболевания, из которых наиболее известны такие, как «красный комплекс», состоящий из *P. gingivalis*, *T. den-*

ticola, *T. forsythensis* [13-15]. Пародонтогены составляют несколько десятков бактериальных видов и подразделяются на две подгруппы в зависимости от степени вирулентности [14]. Пародонтопатогены 1-го порядка связаны с прогрессированием заболевания: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis* [4]. Значение бактерий 2-го порядка – *T. denticola*, *P. intermedia* – в патогенезе заболеваний пародонта пока недостаточно изучено. Пародонтопатогены – это облигатные или факультативные анаэробы, способные к внутриклеточному персистенции в тканях полости рта и, при определенных обстоятельствах, возможна их связь с патологическими процессами в полости рта.

Наиболее важным пародонтопатогеном является *P. gingivalis* в связи с наличием таких факторов вирулентности, как липополисахарид, фимбрии и гингипаины, которые усиливают способность *P. gingivalis* участвовать в патологических процессах тканей пародонта. *P. gingivalis* обладает множеством механизмов ингибирования запрограммированной гибели клеток или апоптоза в эпителиальных клетках.

Что касается *T. forsythensis*, то свойства, связанные с возможностью данного вида способствовать развитию инфекционного процесса, наименее изучены, но известно, что она вырабатывает ферменты, активность которых коррелирует с клиническими признаками пародонтита. *T. forsythensis* обладает способностью активировать процесс программируемой клеточной гибели. Бактерии группы пародонтопатогенов 2-го порядка, *T. denticola* и *P. intermedia*, по степени патогенности уступают *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, но также имеют свойства, позволяющие им играть немаловажную роль в развитии пародонтита. *T. denticola* – изогнутая, подвижная анаэробная спирохета, которая, что очень важно, обладает способностью к образованию ассоциаций с другими бактериями, обуславливая распространение воспалительного процесса. Наиболее часто этот вид образует комплексы с *P. gingivalis* и *T. forsythensis*. Присутствие в микробиоте пациента *T. denticola* в комплексе с другими пародонтопатогенами свидетельствует о том, что локализованный процесс может трансформироваться в генерализованный.

P. intermedia по сравнению с пародонтогенами 1-й группы обладает менее вирулентными свойствами. Но следует отметить ее мощные адгезивные свойства, благодаря чему *P. intermedia* быстро колонизирует ткани полости рта, опережая прочих пародонтогенов и предвзялая инфекционный процесс. *P. intermedia* в качестве единственного возбудителя, как правило, выявляется в начале заболевания, но если она обнаруживается в комплексе с другими пародонтопатогенами, это признак прогрессирования заболевания, а вот при стабилизации процесса она, как правило, отсутствует. Можно предположить, что адгезивные свойства *P. intermedia* создают условия для колонизации тканей другими пародонтопатогенами, формирование биопленки.

Материал и методы. В 2019-2020 годах нами проведено проспективное исследование. В исследование включены 30 пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта отделения опухолей головы и шеи ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России: 15 первичных пациентов (до лечения) и 15 повторных (после проведенной хирургической/химио-/лучевой терапии). Возраст пациентов варьировал от 39 до 84 лет (медиана 61,5 лет).

Взятие образцов опухолевой ткани и здоровой слизистой оболочки полости рта производили после удаления макропрепарата в условиях операционной. Размер биоматериала составлял 5 мм³. Полученные образцы погружали в криопробирки и хранили в условиях морозильной камеры (Sonyo MDF-1930) при температуре -80° С в течение не более 24 ч перед транспортировкой образцов в лабораторию вирусного канцерогенеза ФГБУ НИИ канцерогенеза Минздрава РФ в термоконтейнере с холодowymi аккумуляторами. После постепенного размораживания при комнатной температуре проводилось определение ДНК методом ПЦР-real time качественным методом. Для выделения ДНК использован комплект реагентов ПРОБА-ГС-ПЛУС и ПРОБА-НК-ПЛУС (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия). Для ПЦР-амплификации использован набор реагентов «Пародонтоскрин» с детекцией в режиме реального времени (ООО «ДНК-Технология ТС»). Набор «Пародонтоскрин» предназначен для ПЦР амплификации *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola*. В процессе исследования частота встречаемости каждого из 4-х определяемых видов бактерий регистрировалась в количестве, превышающем установленные пороговые значения содержания маркерной ДНК: 10⁵ – для *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, 10⁶ – для *T. denticola*, *P. intermedia*. Удаленную ткань опухоли исследовали культуральным методом в микробиологической лаборатории ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ. Для идентификации анаэробных микроорганизмов использовали стандартный набор искусственных питательных сред: первичный посев биоматериала производили на агар Шедлера (с добавлением гемина, менадиона и 5% дефибринированной крови крупного рогатого скота) и тиогликолевый бульон. Инкубацию осуществляли стандартно в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов GasPak или системы AnaeroGen при температуре 37° С в течение 48-72 часов. Идентификацию чистой культуры микроорганизмов производили с применением масс-спектрометрического анализа белковой фракции микробной клетки на приборе MALDI-ToF Microflex LT (Biotyper, Bruker Daltonics, Германия). Идентификацию проводили в соответствии с инструкцией производителя. Во всех случаях микроорганизмы идентифицировали до вида. Статистическую достоверность полученных результатов оценивали с помощью дисперсионного анализа с применением критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия с вероятностью не менее 95% ($p < 0,05$) [16]. Статистические расчеты осуществляли с использованием компьютерной программы, разработанной группой медицинской кибернетики НИИ клинической онкологии РОНЦ РАМН.

Результаты и обсуждение. У первичных пациентов ДНК *P. gingivalis* выявлена в 66,7% (10/15) случаев в биоматериалах, представленных опухолевой тканью, тогда как культуральным методом *P. gingivalis* выявлен только в 1 случае (6,6%). *P. intermedia* детектирована ПЦР-РВ в 60% (9/15) проб опухолевой ткани, при культуральном исследовании – в 80% (12/15), то есть, для выявления *P. intermedia* более результативным оказался культуральный метод по сравнению с ПЦР-РВ. Возможно, это объясняется полиморфизмом в генах. *T. forsythensis* и *T. denticola* при культуральном исследовании проб опухолевой ткани не обнаружены, тогда как методом ПЦР-

РВ *T. forsythensis* выявлена в 73,3% (11/15) образцов опухолевой ткани, *T. denticola* – в 46,6% (7/15). Диагностика анаэробных одонтопатогенов методом ПЦР-РВ более информативна по сравнению с культуральным методом, за исключением *P. intermedia* (табл. 1). Культуральный метод должен включаться в исследования спектра микробиоты различных локусов.

P. gingivalis и *P. intermedia* у первичных пациентов в здоровой ткани регистрировались в целом в 66,7% (10/15) случаев каждый вид бактерий, *T. forsythensis* – в 60% (9/15) случаев, *T. denticola* – в 6,7% (1/15) случаев. *P. gingivalis* у первичных пациентов в опухолевой ткани регистрировались в целом в 66,7% (10/15) случаев, *P. intermedia* – в 86,7% (13/15) случаев, *T. forsythensis* – в 73,3% (11/15) случаев, *T. denticola* – в 46,7% (7/15) случаев. У первичных пациентов в опухолевой ткани статистически значимо чаще, чем в здоровой, обнаруживалась *T. denticola*, причём только в ассоциации (7/15, 46,7% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,02$). Остальные виды бактерий регистрировали как в здоровой, так и в опухолевой ткани без статистически значимых различий.

У повторных пациентов в здоровой ткани *P. gingivalis* обнаружена в целом в 80% (12/15) случаев, *P. intermedia* – в 66,7% (10/15) случаев, *T. forsythensis* – в 20% (3/15) случаев, *T. denticola* – в 6,7% (1/15) случаев. У повторных пациентов в опухолевой ткани *P. gingivalis* обнаружена в 100% (15/15) случаев, *P. intermedia* – в 93,3% (14/15) случаев, *T. forsythensis* (3) – в 80% (12/15) случаев, *T. denticola* (4) – в 60% (9/15) случаев. У повторных пациентов в опухолевой ткани статистически значимо чаще, чем в здоровой, выявлены *T. denticola*, (9/15, 60% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,002$), *T. forsythensis* (12/15, 80% против 3/15, 20%, соответственно, $p < 0,001$) и *P. intermedia* (14/15, 93,3% против 10/15, 66,7%, соответственно, $p < 0,02$).

P. gingivalis с повышенной частотой регистрировалась как у первичных, так и у повторных пациентов, в здоровой и в опухолевой ткани. У повторных пациентов в опухолевой ткани *P. gingivalis* выявлена статистически значимо чаще, чем у первичных пациентов (15/15,

100% против 10/15, 66,7%, соответственно, $p < 0,02$). *P. gingivalis* является ключевым фактором структуры микробиома полости рта и, как предполагается, опосредует множественные системные патогенные процессы, включая и ряд видов рака, в том числе и рака полости рта [17, 18].

P. gingivalis, *P. intermedia* с повышенной частотой обнаружены у первичных и у повторных пациентов в здоровой и опухолевой ткани. Статистически значимых различий в частоте регистрации из опухолевой ткани между первичными и повторными пациентами не выявлено.

T. forsythensis: у первичных пациентов статистически значимых различий в частоте выявления из здоровых и опухолевых тканей не обнаружено. В здоровых тканях у первичных пациентов *T. forsythensis* обнаруживалась статистически значимо чаще, нежели у повторных (9/15, 60% против 3/15, 20%, соответственно, $p < 0,05$). У повторных пациентов из опухолевой ткани *T. forsythensis* регистрировалась достоверно чаще, чем в здоровой ткани (12/15, 80% против 3/15, 20%, соответственно, $p < 0,001$).

T. denticola у первичных, и у повторных пациентов в здоровой ткани выявлена в единичных случаях. В опухолевой ткани по сравнению со здоровой *T. denticola* статистически значимо чаще обнаружена как у первичных (7/15, 46,7% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,02$), так и у повторных пациентов (10/15, 66,7% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,001$). Статистически значимых различий по выявлению *T. denticola* в опухолевой ткани между первичными и повторными пациентами не наблюдалось.

P. gingivalis, *T. forsythensis*, *T. denticola*, возможно, следует считать своеобразными маркерами, указывающими на уровень значимости их ассоциаций с заболеванием. Эпидемиологические исследования последних лет показывают значительную связь между пародонтопатогенами и раком полости рта. Знания о вкладе пародонтопатогенов в канцерогенез полости рта и их роли в потенциальных регулирующих механизмах ограничены. Индикатором риска, связанным с развитием рака

Таблица 1

Количество пародонтопатогенов, выявленных методом ПЦР-РВ и микробиологическим методом (посев), в биологических материалах пациентов с орофарингеальным раком

Пациенты	<i>Porphyromonas gingivalis</i>			<i>Prevotella intermedia</i>			<i>Tannerella forsythensis</i>			<i>Treponema denticola</i>		
	ПЦР-РВ		Культуральный метод	ПЦР-РВ		Культуральный метод	ПЦР-РВ		Культуральный метод	ПЦР-РВ		Культуральный метод
	Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%		Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%		Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%		Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%	
Первичные пациенты (n=15)	10/66,7	10/66,7	1/6,7	10/66,7	9/60	12/80	9/60	11/73,3	0	1/6,7	7/46,7	0
Повторные пациенты (n=15)	12/80	15/100	3/20	10/66,7	12/80	14/93,3	3/20	12/80	0	1/6,7	10/66,7	0
<i>p</i> <	0,02						0,05					

полости рта, чаще всего упоминается *P. gingivalis*, информация о роли *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola* в канцерогенезе орофарингеальной области либо отсутствует, либо весьма ограничена [19-23]. На экспериментальных моделях показано, что протеиназа дентилизина *T. denticola* (Td-CTLP) способствует развитию плоскоклеточного рака миндалин и пищевода, рака желудка, поджелудочной железы, толстой кишки [24]. Эти исследования продемонстрировали роль пародонтопатогенов в развитии рака полости рта, тогда как понимание их значения *in vivo* и механизмов патогенеза не выяснено. Получены экспериментальные доказательства того, что присутствие *T. denticola*, *P. gingivalis* в микросреде опухоли изменяет поведение опухолевых клеток, развивается агрессивный фенотип клеток в процессе канцерогенеза полости рта.

В организме человека микробиота функционирует как единый комплекс, и один какой-то вид микроорганизмов не может играть определяющую роль в канцерогенезе [25]. Установлено, что ассоциации бактерий связаны со значительными воспалительными процессами, повышением вирулентности бактерий [26].

В нашем исследовании у 33,3% (5/15) первичных пациентов спектр микроорганизмов одинаков в здоровой и в опухолевой ткани (табл. 2).

У 20% (3/15) первичных пациентов в здоровой ткани не выявлено ассоциаций данных микроорганизмов. У 13,3% (2/15) пациентов выявлен один вид бактерий из 4-х: в одном случае *P. gingivalis*, в другом – *T. forsythensis*, оба относятся к пародонтопатогенам 1-го порядка. У 46,7% (7/15) первичных пациентов в здоровой ткани чаще всего регистрировалась одинаковая по составу ассоциация из *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*. *T. denticola* у первичных пациентов в здоровой ткани регистрировалась только в одном случае в ассоциации с *P. gingivalis* и *P. intermedia*.

У 93,3% (14/15) первичных пациентов в опухолевой ткани регистрировались ассоциации из 2-4-х микроорганизмов, в здоровой ткани – ассоциация из 3-х одинаковых по составу бактерий выявлялась достаточно часто и составила 40% (6/15): *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*. У 46,7% (7/15) первичных пациентов в опухолевой ткани *T. denticola* входила в ассоциацию из 2-4-х бактерий, причём в здоровой ткани у этих пациентов *T. denticola* не регистрировалась. Ассоциация из 4-х бактерий у первичных пациентов в опухолевой ткани регистрировалась только в одном случае.

У 33,3% (5/15) повторных пациентов спектр микроорганизмов одинаков в здоровой и в опухолевой ткани (табл. 3).

У 13,3% (2/15) повторных пациентов в здоровой ткани вообще не выявлено ассоциаций данных микроорганизмов. У 20% (3/15) в здоровой ткани выявлен только один вид бактерий – *P. gingivalis*. *T. denticola* у повторных пациентов в здоровой ткани регистрировалась только у одного пациента в ассоциации с *P. gingivalis* и *P. intermedia*.

У 100% (15/15) повторных пациентов в опухолевой ткани регистрировались ассоциации из 2-4-х микроорганизмов, причём, ассоциация из 4-х бактерий выявлена часто и составила 53,3% (8/15): *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *T. denticola*.

Ассоциации из 4-х бактерий регистрировались только в опухолевой ткани у первичных и у повторных пациентов, у повторных – статистически значимо чаще (1/15, 6,7% против 8/15, 53,3%, соответственно, $p < 0,01$) (рис. 1 и 2).

Микробиом человека – новая цель в области развития рака и его лечения. Хотя большая часть этих исследований всё ещё находится на ранней стадии, а технологии, используемые для анализа, продолжают развиваться, существует очевидный потенциал для использования микробиоты для прогнозирования раз-

Таблица 2

Ассоциации *P. gingivalis* (1), *P. intermedia* (2), *T. forsythensis* (3), *T. denticola* (4) у первичных пациентов

Первичные пациенты	Ассоциация из 1-4 возбудителей	
	Здоровая ткань	Опухолевая ткань
1	0	1+2
2	1+2+3	1+2+3
3	1+2+3	1+2+3
4	1+2+3	1+2+3
5	1+2+3	1+2+4
6	1+2+4	2
7	1+2+3	1+2+4
8	3	3+4
9	1+2	2+3+4
10	0	3+4
11	0	2+3+4
12	1+2+3	1+2+3
13	2+3	1+2+3
14	1+2+3	1+2+3
15	1	1+2+3+4

Таблица 3

Ассоциации *P. gingivalis* (1), *P. intermedia* (2), *T. forsythensis* (3), *T. denticola* (4) у повторных пациентов

Повторные пациенты	Ассоциация из 1-4 возбудителей	
	Здоровая ткань	Опухолевая ткань
1	1+2+3	1+2+3
2	1+2+4	1+2+4
3	1+2	1+2+3+4
4	0	1+2+3+4
5	1+2	1+2+3+4
6	1	1+2+3+4
7	1+2	1+2
8	1+2	1+2
9	1+2	1+2+3+4
10	0	1+2+3+4
11	2+3	1+2+3
12	1	1+2+3+4
13	1+2+3	1+2+3
14	1+2	1+2+3+4
15	1	1+3+4

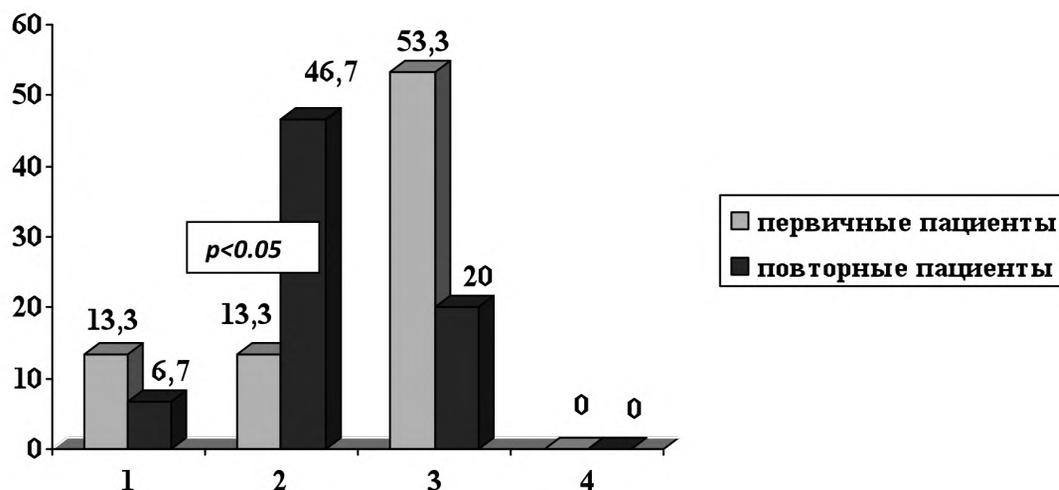


Рис. 1. Частота ассоциаций бактерий (в %) у первичных и повторных пациентов в здоровой ткани.

Здесь и на рис. 2: 1 – один микроорганизм, 2 – ассоциация из 2-х микроорганизмов, 3 – ассоциация из 3-х микроорганизмов, 4 – ассоциация из 4-х микроорганизмов.

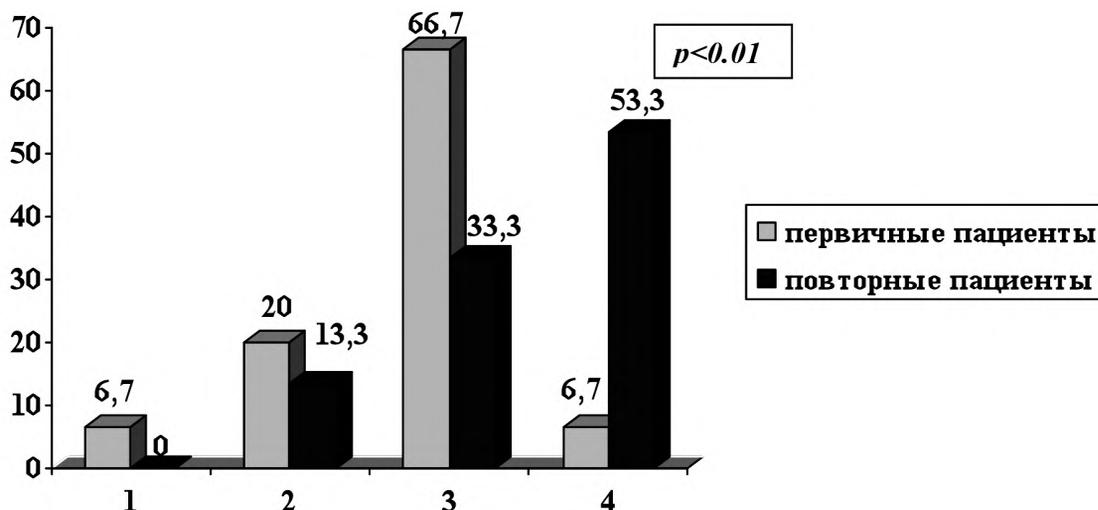


Рис. 2. Частота ассоциаций бактерий (в %) у первичных и повторных пациентов в опухолевой ткани.

вития рака и применения определённых её видов в качестве прогностического биомаркера при раке. Всё больше появляется исследований, подтверждающих гипотезу о том, что микробиом может влиять на эффективность иммунотерапии, химиотерапии и других методов лечения. Коррекция микробиома может обеспечить методы повышения эффективности лечения, снижения токсичности лечения и, возможно, даже для предотвращения канцерогенеза [27, 28]. Многообразие факторов, влияющих на процесс канцерогенеза и прогрессирование заболевания, усложняют изучение многих аспектов онкогенеза. До сих пор остается не вполне неясным, какие же механизмы запускают процессы, связанные с развитием или прогрессированием заболевания. Основные усилия мирового сообщества ученых направлены на выявление маркеров, которые позволяют определить группы риска ещё до развития рака орорингеальной области, а также факторы риска, которые необходимо принимать во внимание, чтобы предотвратить или изменить течение заболевания.

Выводы

1. Выявление пародонтопатогенов методом ПЦР РВ более информативно по сравнению с культуральным методом, за исключением *P. intermedia*, для определения которой культуральный метод более результативный. *P. intermedia* с повышенной частотой выделена у первичных и у повторных пациентов из здоровой и из опухолевой ткани; статистически значимых различий в частоте обнаружения в опухолевой ткани между первичными и повторными пациентами не выявлено.

2. Ассоциации из 4-х бактерий регистрировались только в опухолевой ткани у первичных и у повторных пациентов, у повторных – статистически значимо чаще (1/15, 6,7% против 8/15, 53,3%, соответственно, $p < 0,01$).

3. *P. gingivalis* из опухолевой ткани у повторных пациентов выделена статистически значимо чаще, чем у первичных пациентов (15/15, 100% против 10/15, 66,7%, соответственно, $p < 0,02$).

4. *T. forsythensis* у первичных пациентов в здоровых тканях выявлена статистически значимо чаще,

нежели у повторных пациентов (9/15, 60% против 3/15, 20%, соответственно, $p < 0,05$). Кроме того, у повторных пациентов из опухолевой ткани *T. forsythensis* выявлялась статистически значимо чаще, чем в здоровой ткани (12/15, 80% против 3/15, 20%, соответственно, $p < 0,001$).

5. *T. denticola* в здоровой ткани выявлялась у первичных и повторных пациентов в единичных случаях. Но, в опухолевой ткани *T. denticola* по сравнению со здоровой статистически значимо чаще обнаруживалась у первичных (7/15, 46,7% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,02$) и у повторных пациентов (10/15, 66,7% против 1/15, 6,7%, соответственно, $p < 0,001$).

6. Определённые микроорганизмы, связанные с воспалительными процессами в полости рта, возможно, следует считать своеобразными биомаркерами, указывающими на уровень значимости их связи с заболеванием. Индикаторами риска, вероятно, являются *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *T. denticola*. Для более определённых выводов необходимо продолжить исследование, расширив его дизайн и включив большее число пациентов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 6-9, 12-28
см. REFERENCES)

- Арутюнов С.Д., Леонтьев В.К., Цимбалитов А.В., Дробышев А.Ю., Барденштейн Л.М., Харазян А.Э. и др. Профессиональные риски хирургического и ортопедического лечения пациентов с приобретенными дефектами лица и челюстей (обзор литературы). *Актуальные проблемы медицины*. 2020; 43(2): 285-303. DOI: 10.18413/2687-0940-2020-43-2-285-303.
- Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ягодина Е.В., Трефилова Ю.А., Ипполитов Е.В. Молекулярные методы диагностики гингивита и пародонтита у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (1): 54-9.
- Царёв В.Н., Арутюнов С.Д., Балмасова И.П., Бабаев Э.А., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. и др. Молекулярная диагностика пародонтита и метагеномный анализ микробиоты пародонта у пациентов с сахарным диабетом II типа. *Бактериология*. 2018; 3(2): 30-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37.
- Григорьевская З.В., Терещенко И.В., Казимов А.Э., Багирова Н.С., Петухова И.Н., Мудунов А.М. и др. Микробиота полости рта и ее значение в генезе рака орофарингеальной зоны. *Злокачественные опухоли*. 2020; 3 (Приложение 1): 54-9. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s1-54-59.
- Орехова Л.Ю., Жаворонкова М.Д., Суборова Т.Н. Современные технологии бактериологического исследования пародонтальных пространств. *Пародонтология*. 2013; 18(2): 9-13.

REFERENCES

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018; 68: 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Arutyunov S.D., Leontiev V.K., Tsimbalistov A.V., Drobyshev A.Yu., Bardenshtein L.M., Kharazyan A.E. et al. Professional risks of surgical and orthopedic treatment of patients with acquired defects of the face and jaws (literature review). *Aktual'nye problemy meditsiny*. 2020; 43 (2): 285-303. DOI:10.18413/2687-0940-2020-43-2-285-303.(in Russian)
- Miranda-Galvis M., Loveless R., Kowalski L.P., Teng, Y. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. *Cells*. 2021; 10: 389. DOI: 10.3390/cells10020389.
- Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Yagodina E.V., Trefilova Yu.A., Ippolitov E.V. Molecular methods for the diagnosis of gingivitis and

- periodontitis in HIV-infected patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61 (1): 54-9. (in Russian)
- Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Balmasova I.P., Babaev E.A., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. et al. Molecular diagnosis of periodontitis and metagenomic analysis of periodontal microbiota in patients with type II diabetes mellitus. *Bakteriologiya*. 2018; 3 (2): 30-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-2-30-37. (in Russian)
- Shun-Fa Yang, Hsien-Da Huang, Wen-Lang Fan, Yuh-Jyh Jong, Mu-Kuan Chen, Chien-Ning Huang, Chun-Yi Chuang, Yu-Lun Kuo, Wen-Hung Chung, Shih-Chi Su. Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer. *Oral Oncol*. 2018; 7: 1-8. DOI:10.1016/j.oraloncology. 2017.12.005.
- Wang H., Funchain P., Bebek G., Altemus J., Zhang H., Niazi F. et al. Microbiomic differences in tumor and paired-normal tissue in head and neck squamous cell carcinomas. *Genome Med*. 2017; 9 (1):14. DOI: 10.1186/s13073-017-0405-5.
- Divya Gopinath, Rohit Kunat Menon, Moinak Banerjee, Richard Su Yuxiong, Michael George Botelho, Newell W. Johnson. Culture independent studies on bacterial dysbiosis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A systematic review. *Crit. Rev. Oncol / Hematol*. 2019; 139: 31-40. DOI: 10.1016 / j.critrevoncol. 2019.04.018.
- Yangheng Zhang, Xiang Wang, Houxuan Li, Can Ni, Zhibin Du, Fuhua Yan. Human oral microbiota and its modulation for oral health. Review. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 99. 2018; 883-93. DOI:10.1016/j.biopha.2018.01.146.
- Grigorievskaya Z.V., Tereshchenko I. V., Kazimov A. E., Bagirova N.S., Petukhova I. N., Mudunov A. M. et al. Oral microbiota and its role in the genesis of oropharyngeal cancer. *Zlokačestvennye opukholi*. 2020; 3 (Suppl.1): 54-9. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s1-54-59. (in Russian)
- Orekhova L.Yu., Zhavoronkova M.D., Suborova T.N. Modern technologies of bacteriological research of periodontal spaces. *Parodontologiya*. 2013; 18(2): 9-13. (in Russian)
- Krishnan K., Chen T., Paster B.J. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral. Dis*. 2017; 23: 276-86. DOI:10.1111/odi.12509.
- Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol*. 1998; 25: 134-44. DOI:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x.
- Tomasz M. Karpiński. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. Review. *Microorganisms*. 2019; 7(1): 20. DOI:10.3390/microorganisms7010020.
- Brandon Khor, Michael Snow, Elisa Herrman, Nicholas Ray, Kunal Mansukhani, Karan A. Patel et al. Interconnections between the oral and gut microbiomes: reversal of microbial dysbiosis and the balance between systemic health and disease. *Microorganisms*. 2021; 9(3): 496. DOI: 10.3390/microorganisms9030496.
- Glantz Stanton A. Primer of BIostatistics. 4th ed. McGraw-Hill. New York; 1999.
- Audrey Renson, Heidi E. Jones, Francesco Beghini, Nicola Segata, Christine P. Zolnik, Mykhaylo Usyk et al. Sociodemographic variation in the oral microbiome. *Annals of Epidemiology* 35. 2019; 73-80. DOI:10.1016/j.annepidem.2019.03.006.
- Aneasha Acharya, Yuki Chan, Supriya Kheur, Li Jian Jin, Rory M. Watt, Nikos Mattheos. Salivary microbiome in non-oral disease: A summary of evidence and commentary. *Archives of Oral Biology*. 2017; 83:169-73. DOI:10.1016/j.archoralbio.2017.07.019.
- Zhou Y., Luo G.H. Porphyromonas gingivalis and digestive system cancers. *World J. Clin. Cases*. 2019; 7(7): 819-29. DOI: 10.12998/wjcc.v7.i7.819.
- Ingar Olsen and Özlem Yilma. Possible role of Porphyromonas gingivalis in orodigestive cancers. *Journal of oral microbiology*. 2019; 11: 156-3410. DOI:10.1080/20002297.2018.1563410.
- Qinyang Li, Yao Hu, Xuedong Zhou, Shiyu Liu, Qi Han and Lei Cheng. Role of Oral Bacteria in the Development of Oral Squamous

MICROBIOLOGY

- Cell Carcinoma. Review. *Cancers*. 2020; 12: 2797. DOI:10.3390/cancers12102797.
22. Kamarajan P., Ateia I., Shin J.M. Fenno J.C., Le C., Zhan L.A., Chang R., Darveau Y. Kapila. 2020. Periodontal pathogens promote cancer aggressivity via TLR/MyD88 triggered activation of Integrin/FAK signaling that is therapeutically reversible by a probiotic bacteriocin. *PLoS Pathog*. 16 (10): e1008881. DOI:10.1371/journal.ppat.1008881.
 23. Sriram Kaliamoorthy, Saranyan R., Aishwarya Durai. Role of Treponema Denticola in Oral Cancer – A Review on Direct and Indirect Mechanisms. *Int. J. Dentistry Oral Sci*. 2021; 8(1): 1367-70. DOI:10.19070/2377-8075-21000270.
 24. Nieminen M.T., Listyarifah D., Hagstrom J., Haglund C., Grenier D., Nordstrom D. et al. Treponema denticola chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. *Br. J. Cancer*. 2018; 118(3): 428-34. DOI:10.1038/bjc.2017.409. Epub 2017 Nov 16.
 25. Heidi Tuominen, Jaana Rautava. Oral Microbiota and Cancer Development. Review. *Article/ Pathobiology*. 2021; 88:116-26. DOI: 10.1159/000510979.
 26. Ezzo P.J., Cutler C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2003; 32: 24-35. DOI: 10.1046/j.0906-6713.2003.03203.x.
 27. Sarah L. Picardo, Bryan Coburn, Aaron R. Hansen. The microbiome and cancer for clinicians. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019; 141:1-12. DOI:10.1016/j.critrevonc.2019.06.004.
 28. Jennifer L. McQuade, Carrie R. Daniel, Beth A. Helmink, Jennifer A. Wargo. Review. Modulating the microbiome to improve therapeutic response in cancer. *Lancet Oncol*. 2019; 20: e77-91. www.thelancet.com/oncology Vol. 20 February 2019.