

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ
ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
СПЕЦИАЛИСТОВ
ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 67

5 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

МАЙ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостроповская ул.,
д. 5, строение 14

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

**Ответственность за достоверность
информации, содержащейся в рекламных
материалах, несут рекламодатели**

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 25.04.2022.

Подписано в печать 20.05.2022.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,87.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Журнал представлен в базе данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ) и в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клиническая лабораторная диагностика.
2022. № 5. 257–320.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА,
А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ,
Л.М. СКУИНИН, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

THE ALL-RUSSIAN
ORGANIZATION
"THEORETICAL AND
PRACTICAL SOCIETY
OF SPECIALISTS
OF LABORATORY
MEDICINE"

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 67
5 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MAY

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

**The responsibility for credibility of
information contained in advertising materials
is accounted for advertisers**

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

All rights reserved. Any part of this edition can not be entered computer memory nor be reproduced with any other mode without preliminary permission of editor in written form.

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Abstracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Previews, VINITI RAN Referativnyi Zhurnal, Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY,
L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA
(executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV
(*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK
(*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*),
T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*),
A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KOR-
SHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV
(*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYZTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Типисова Е.В., Молодовская И.Н., Аликина В.А., Елфимова А.Э.*
Отличительные черты состояния системы гипоталамус-гипофиз-гонады и уровня дофамина у мужчин Европейского и Азиатского Севера261
- Александрин С.С., Алхутова Н.А., Ковязина Н.А., Жижина О.Л., Нестеренко Н.В., Рыбников В.Ю.*
Лабораторные маркеры адаптации к условиям Арктики: научный поиск и перспективы внедрения ... 267
- Усманова З.А., Розыходжаева Г.А., Арипов А.Н.*
Сравнение уровня цинка в различных биосубстратах больных с нестабильными атеросклеротическими бляшками271

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Мурашко Д.И., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Готько О.В., Прохорова В.И.*
К вопросу о диагностической ценности определения уровня рецепторов клеток крови и их лигандов в сыворотке крови при немелкоклеточном раке легкого277

ИММУНОЛОГИЯ

- Рагимова Р.Р.*
Аутоиммунный тиреоидит (обзор литературы) 286
- Бутина Е.В., Шерстнев Ф.С., Максимов О.Д., Йовдий А.В., Парамонов И.В.*
Роль генов HLA в развитии HLA-аллоиммунизации у реципиентов компонентов крови 292

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Пименова А.С., Гадуа Н.Т., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С.*
Влияние разных типов сухих тампонов и условий их хранения на высеваемость *Corynebacterium diphtheria* 296
- 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 области301
- Омарова С.М., Алиева А.И., Исаева Р.И., Акаева Ф.С., Миронов А.Ю., Митрохин С.Д.*
Иммунные и микробиологические нарушения у женщин с инфекционно-воспалительной патологией шейки матки309

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Поликарпова С.В., Жилина С.В., Фёдорова Н.И., Семькин С.Ю., Чаплин А.В., Коростин Д.О., Маянский Н.А., Чеботарь И.В.*
Характеристика изолятов *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации315

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Tipisova E.V., Molodovskaya I.N., Alikina V.A., Elfimova A.E.*
Distinctive features of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and the level of dopamine in men of the European and Asian North261
- Aleksanin S.S., Alkhutova N.A., Kovyazina N.A., Zhizhina O.L., Nesterenko N.V., Rybnikov V.Yu.*
Laboratory markers of adaptation to Arctic conditions: scientific search and prospects of implementation. . . .267
- Usmanova Z.A., Rozikhodjaeva G.A., Aripov A.N.*
Comparison of zinc levels in the various biosubstrates of patients with unstable atherosclerotic plaque271

HEMATOLOGY

- Murashka D.I., Tahanovich A.D., Kauhanka M.M., Prokhorova V.I., Gotko O.V.*
On the issue of diagnostic value of determining the level of receptors and their ligands in blood in non-small cell lung cancer277

IMMUNOLOGY

- Rahimova R.R.*
Autoimmune thyroiditis (review of literature).....286
- Butina E.V., Sherstnev F.S., Maksimov O.D., Yovdiy A.V., Paramonov I.V.*
Role of HLA genes in development of HLA-alloimmunization in blood recipients292

MICROBIOLOGY

- Pimenova A.S., Gadua N.T., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S.*
Effect of different types of dry swabs and their storage conditions on the inoculation of *Corynebacterium diphtheriae*.296
- 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.301
- Omarova S.M., Alieva A.I., Isaeva R.I., Akayeva F.S. Mironov A.Yu. Mitrokhin S.D.*
Immune and microbiological disorders in women with infectious and inflammatory pathology of the cervix 309

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Bocharova Yu.A., Savinova T.A., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Polikarpova S.V., Zhilina S.V., Fedorova N.I., Semykin S.Yu., Chaplin A.V., Korostin D.O., Mayansky N.A., Chebotar I.V.*
Characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients in Russia315

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Типисова Е.В., Молодовская И.Н., Аликина В.А., Елфимова А.Э.

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ЧЕРТЫ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГИПОТАЛАМУС-ГИПОФИЗ-ГОНАДЫ И УРОВНЯ ДОФАМИНА У МУЖЧИН ЕВРОПЕЙСКОГО И АЗИАТСКОГО СЕВЕРА

ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лавёрова Уральского отделения РАН, 163000, г. Архангельск, Россия

На современном этапе наблюдается снижение репродуктивного потенциала, особенно у жителей Арктических территорий, испытывающих напряжение со стороны различных систем организма, в том числе и состояния гормональной обеспеченности репродуктивной функции. Изучение соотношения уровней дофамина и содержания половых гормонов у мужского населения различных Арктических регионов является актуальным ввиду повышенного напряжения со стороны дофаминергической системы и системы гипоталамус-гипофиз-гонады у жителей Северных регионов, а также недостаточности сведений об их взаимодействии среди практически здорового населения. Целью исследования является изучение возможного влияния дофамина при различных его концентрациях в крови на содержание половых гормонов и секс-стероидсвязывающего β -глобулина (СССГ) у практически здоровых мужчин Арктической зоны РФ с учетом территории проживания. Обследованы 181 мужчина в возрасте от 22 до 60 лет, проживающих на территориях европейского и Азиатского Севера. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке и плазме крови определяли уровни половых гормонов, СССР, дофамина. У жителей Азиатского Севера по сравнению с мужчинами Европейского Севера регистрируются более высокие уровни дофамина, лютеинизирующего гормона, прогестерона, пролактина, эстрадиола, СССР при снижении свободных фракций тестостерона в крови. Референсные уровни дофамина у мужчин Европейского Севера сочетаются со стимулирующим эффектом дофамина на уровни ЛГ, что может свидетельствовать об усилении стероидогенеза половых гормонов. Высокие уровни дофамина у мужчин Азиатского Севера сочетаются с увеличением уровней эстрадиола, что может быть связано с влиянием дофамина на ароматизацию тестостерона. Отдельный регион, имеющий экологические различия, характеризуется наличием особенностей компенсаторно-приспособительных реакций со стороны дофаминергической системы и системы гипоталамус-гипофиз-гонады. Выявленные особенности могут помочь в проведении превентивных мероприятий, направленных на сохранение мужского репродуктивного потенциала жителей Арктических территорий.

Ключевые слова: половые гормоны; секс-стероидсвязывающий β -глобулин; дофамин; Арктика; мужчины.

Для цитирования: Типисова Е.В., Молодовская И.Н., Аликина В.А., Елфимова А.Э. Отличительные черты состояния системы гипоталамус-гипофиз-гонады и уровня дофамина у мужчин Европейского и Азиатского Севера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(5): 261-266. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-261-266>

Для корреспонденции: Типисова Елена Васильевна, д-р биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. эндокринологии им. проф. А.В. Ткачева; e-mail: tipisova@rambler.ru

Финансирование. Работа выполнена в соответствии с госзаказом ФНИР ФГБУН ФИЦКИА УрО РАН (номер гос. регистрации 122011800392-3).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ГКУ ЯНАО «Научный центр изучения Арктики» (г. Салехард) д-ру мед. наук Лобанову А.А., канд. мед. наук Попову А.И., канд. мед. наук Андронову С.В., Кочкину Р.А. за помощь в организации сбора биологического материала на территории Ямало-Ненецкого автономного округа Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2021

Принята к печати 29.11.2021

Опубликовано 21.05.2022

Tipisova E.V., Molodovskaya I.N., Alikina V.A., Elfimova A.E.

DISTINCTIVE FEATURES OF THE HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS AND THE LEVEL OF DOPAMINE IN MEN OF THE EUROPEAN AND ASIAN NORTH

N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 163000, Arkhangelsk, Russia

In recent years, there has been a decrease in reproductive potential, especially among residents of the Arctic territories, having the greatest stress from various body systems, including the state of the hormonal regulation of the male reproductive system. The study of the dopamine levels and the content of sex hormones in the male population of various Arctic regions is relevant due to the increased stress on the part of the dopaminergic system and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in residents of the Northern regions, as well as the lack of information about their interaction among the apparently healthy population. The aim of the investigation is to study the possible effect of various plasma concentrations of the dopamine on the content of sex hormones and sex-steroid-binding β -globulin (SHBG) in apparently healthy men in the Arctic zone of the Russian Federation, taking into account the territory of residence. There were examined 181 men aged 22-60 years, living in the territories of the

European and Asian North. The levels of sex hormones, SHBG, and dopamine were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay. The inhabitants of the Asian North in comparison with the men of the European North have higher levels of dopamine, luteinizing hormone, progesterone, prolactin, estradiol and SHBG with decreased serum levels of free fractions of testosterone. Reference levels of dopamine in men from the European North are combined with the stimulatory effect of dopamine on LH levels, which may indicate an increase steroidogenesis. The high levels of dopamine in men from the Asian North are combined with increased level of estradiol, which may be related to the effect of dopamine on testosterone aromatization. The separate region with its ecological differences is characterized by the presence of features of compensatory-adaptive reactions of an organism in male representatives on the part of the dopaminergic system and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. The identified features can help in carrying out preventive measures aimed at preserving the male reproductive potential of the inhabitants of the Arctic territories.

Key words: sex hormones; sex hormone-binding β -globulin; dopamine; Arctic; men.

For citation: Tipisova E.V., Molodovskaya I.N., Alikina V.A., Elfimova A.E. Distinctive features of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and the level of dopamine in men of the European and Asian North. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 261-266 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-261-266>

For correspondence: Tipisova E.V., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Endocrinology named after prof. A.V. Tkachev; e-mail: tipisova@rambler.ru

Information about authors:

Tipisova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-2097-3806>;
Molodovskaya I.N., <https://orcid.org/0000-0003-3097-9427>;
Alikina V.A., <https://orcid.org/0000-0002-0818-7274>;
Elfimova A.E., <https://orcid.org/0000-0003-2519-1600>.

Funding. The reported study was funded by the FECIAR UrB RAS according to the research project № 122011800392-3.

Acknowledgment. The authors are grateful to the staff of the State Scientific Institution of Yamalo-Nenets Autonomous District "Scientific center of Arctic research" (Nadym) in the person of A.A. Lobanov, Candidate of Medical Sciences A.I. Popov, candidate of medical sciences S.V. Andronov, R.A. Kochkin for the assistance in collecting biological material in the territory of the Yamalo-Nenets Autonomous District.

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

Received 01.04.2021
Accepted 29.11.2021
Published 21.05.2022

Введение. Изучение регулирующих механизмов, обуславливающих активность гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы у населения Северных территорий, является актуальным ввиду снижения потенциала репродуктивного здоровья на современном этапе [1, 2]. Особенно это касается жителей Арктических территорий, подверженных наибольшему напряжению со стороны различных систем организма, в том числе и состояния гормональной обеспеченности репродуктивной функции [3-5]. У жителей Арктики и Антарктики показана чрезмерная активация симпато-адреналовой системы [6-10]. Дофамин как ее элемент оказывает влияние на организм человека, в том числе и на активность системы гипоталамус-гипофиз-гонады.

Дофамин может напрямую оказывать влияние на процессы фосфорилирования фермента ароматазы [11], основного фермента, участвующего в ароматизации тестостерона в эстрадиол [12], стимулирует β 2-адренорецепторы, локализованные на клетках Лейдига, используя цАМФ в качестве вторичного посредника, и тем самым запускает процесс стероидогенеза у неполовозрелых особей [13]. В нейроэндокринной регуляции секреции пролактина из передней доли гипофиза дофамин играет двойную роль. Общеизвестным является ингибирующее действие дофамина на синтез и секрецию пролактина, который модулирует понижение синтеза фермента ароматазы (цитохром-P450) [14]. Однако дофамин при концентрациях, значительно меньших, чем те, которые необходимы для ингибирования секреции пролактина, фактически стимулируют её [15]. Результаты подобных экспериментов позволяют говорить о наличии

дозозависимого эффекта дофамина в отношении лактотрофов гипофиза. Доказано, что дофамин ингибирует секрецию гонадолиберина в аркуатных ядрах гипоталамуса, что приводит к снижению уровня ЛГ в кровяном русле [16]. В то же время возбуждающий эффект низких доз и подавляющий эффект высоких доз дофамина на секрецию гонадолиберина, описанные в экспериментальных исследованиях [17], подтверждают наличие додозависимого эффекта дофамина на секрецию гонадолиберина.

Несмотря на наличие в отечественной и зарубежной литературе достаточного количества научных сведений о концентрации в крови секс-стероидсвязывающего глобулина [18], дофамина [4, 7] и половых гормонов, работ по изучению их концентраций у представителей северных территорий на современном этапе не достаточно [19, 20]. Показано, что эффекты дофамина на секрецию ГнРГ и пролактина могут носить как стимулирующий, так и ингибирующий характер. Однако подробные исследования проводились, в основном, либо в экспериментальных исследованиях *in vivo* и *in vitro* моделях, либо в ходе клинических исследований. В связи с этим, целью исследования является изучение региональных особенностей и возможного влияния дофамина при различных его концентрациях в крови на уровни половых гормонов и СССГ у практически здоровых жителей Арктической зоны РФ с учетом территории проживания.

Материал и методы. В аналитическом поперечном неконтролируемом исследовании использовали материал (сыворотка, плазма крови, данные анкет), собранный в ходе проведения экспедиций с 2009 по

2016 г. как на территориях Европейского Севера (п. Нельмин НАО (67°58' с.ш.), МО «Совпольское» (65°17' с.ш.), МО «Соянское» (65°46' с.ш.), с. Долгощелье Мезенского района Архангельской области (66°05' с.ш.), оленеводы Канинской тундры, кочующие в районе п. Пинега НАО (64°42' с.ш.)), так и на территориях Азиатского Севера (с. Се-Яха Ямалского района ЯНАО (70°10' с.ш.), п. Гыда Тазовского района ЯНАО (70°53' с.ш.), п. Тазовский Тазовского района ЯНАО (67°27' с.ш.)). В целях исключения влияния фактора фотопериодизма, все экспедиции проведены в один и тот же световой период года – в период увеличения продолжительности светового дня. При сравнении характеристик изучаемых регионов можно отметить, что, согласно данным дневника наблюдений участников экспедиции, погода в марте на азиатском Севере (п. Тазовский Тазовского района ЯНАО) отличается более низкой среднемесячной температурой (-20 °С) относительно показателей на европейском Севере (п. Нельмин-Нос НАО) (-11 °С). В связи с этим, более длительное холодное воздействие в азиатской части РФ может отразиться не только на активности ряда гормональных систем, но и на нейро-эндокринных механизмах адаптации.

Обследовали 181 мужчину 22-60 лет, родившихся и проживающих на северных территориях не менее, чем в трех поколениях. В соответствии с классификацией ВОЗ мужчины были подразделены на возрастные группы 22-44 года (молодой возраст) и 45-60 лет (средний возраст). Критериями исключения из исследования были лица, состоявшие на учете у эндокринолога, андролога, кардиолога, а также злоупотреблявшие накануне алкоголем и недавно перенёвшие острые респираторные заболевания и стресс. Обследование проводилось с 8:00 до 10:00 часов утра, натощак, с добровольного согласия волонтеров и в соответствии с документом «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с изменениями и дополнениями 2008 г.). Дизайн обследования, анкеты были согласованы с Комиссией по биомедицинской этике Института физиологии природных адаптаций ФГБУН ФИЦКИА РАН (протокол № 2 от 04.11.2016 г.). Было проведено анкетирование и осмотр пациентов. Далее у обследуемых проводили взятие крови из локтевой вены в пробирки типа «IMPROVACUTER». Кровь центрифугировали в течение 15-20 мин при 1500 об/мин. Собранную сыворотку расфасовывали в микропробирки и хранили в замороженном состоянии до момента проведения анализа.

Количественную оценку концентрации гормонов в сыворотке и плазме крови проводили методом иммуноферментного анализа на аппарате ELISYS Uno («Human», Германия). Содержание лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), пролактина определяли в сыворотке крови с помощью тест-наборов фирмы ООО «Хема» (Россия); уровни прогестерона, тестостерона, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С) – с помощью наборов фирмы ООО «Алкорбио» (Россия); свобод-

ного тестостерона (св.Т), эстрадиола, антиспермальных антител (АСАТ) – DRG Instruments GmbH (Германия), секс-стероид-связывающего β-глобулина (СССГ) – ООО «Хема» (Россия), дофамина в плазме крови – «LDN» (Германия).

Проведена статистическая обработка данных с учетом возраста и района проживания (европейский и азиатский Север). Все статистические анализы были выполнены с использованием программы «Statistica 10.0». Определение нормальности распределения признаков проверяли критерием Шапиро-Уилка, показавшем, что в большинстве случаев существуют отличия распределения признака от нормального вида, в связи с чем применялись непараметрические методы анализа. Количественные данные представлены в виде медиан и процентильных интервалов (10 %; 90 %). При сравнении количественных признаков независимых групп использовался U-критерий Манна-Уитни. Оценку силы связей между признаками проводили с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена. Пороговое значение уровня значимости принято равным 0,05, тенденцией считали значения более 0,05, но менее 0,1.

Для оценки независимой ассоциации уровней половых гормонов с уровнем дофамина была построена множественная линейная регрессионная модель. Поскольку распределение значений в выборках не подчинялось закону распределения Гаусса, для выполнения регрессионного анализа данным в выборке присваивали значения соответствующих натуральных логарифмов (Ln). Определяли значение критерия Дарбина-Уотсона (DW). Для подтверждения адекватности регрессионной модели гистограмма остатков должна была иметь нормальное распределение. Линейное уравнение регрессии имело вид:

$$y = a + b \cdot x, \quad (1)$$

где b – угловой коэффициент уравнения регрессии (показатель наклона линии линейной регрессии), a – свободный член уравнения, y – зависимая переменная (уровень полового гормона), x – независимая переменная (уровень дофамина в крови).

Результаты. Выявлено, что среди жителей Азиатского Севера больше процент лиц с содержанием в крови дофамина выше нормативных значений. Так, среди мужчин Азиатского Севера он составляет 40 против 10 % на европейском Севере ($p = 0,0004$). Помимо высоких уровней дофамина регистрируются также и нулевые его значения, что, напротив, в большей степени выражено среди жителей Европейского Севера. Так, процент лиц с недетектируемыми значениями дофамина среди мужчин Азиатского Севера составляет 5 против 16 % на европейском Севере ($p = 0,03$).

Для мужского населения Азиатского Севера по отношению к европейскому Северу характерны значимо более высокие концентрации дофамина и прогестерона не зависимо от возраста (см. таблицу). Кроме того, в группе мужчин 22–44 лет отмечены более высокие уровни ЛГ при снижении уровней св.Т, а в группе мужчин старше 44 лет – пролактина и эстради-

BIOCHEMISTRY

ола. Регистрируется, что пределы колебаний ЛГ, пролактина, прогестерона, эстрадиола превышают установленные границы норм, а содержание свободных фракций тестостерона выходит за нижнюю границу нормы. Так, частота выявления высоких уровней ЛГ у мужчин в соответствии с возрастом, составила 7 и 28% на европейском Севере и 26 ($p=0,015$) и 28% на азиатском Севере; пролактина – 28 и 15% и 39; 14%; прогестерона – 27; 38% и 89; 78% ($p<0,001$); эстрадиола – 17; 11% и 26; 22%, соответственно. Процент лиц с низкими уровнями св.Т у мужчин Европейского Севера – 12 и 2%, а у мужчин Азиатского Севера – 26 и 21% ($p=0,005$), соответственно возрасту. Относительно общих фракций тестостерона отмечены как низкие, так и высокие его концентрации (12 и 14% и 26 ($p=0,08$) и 22% низких и 23; 11% и 37; 22% высоких концентраций, соответственно, возрасту и территории проживания.

Подобная динамика отмечается также в отношении белка, связывающего половые гормоны (СССГ), уровень которого у представителей Азиатского Севера вдвое превышает показатели у лиц Европейского Севера не зависимо возраста. Кроме того, во всех группах независимо от региона проживания есть доля лиц, у ко-

торых значения СССР превышали норму, однако жителей с выходящими за норму значениями на азиатском Севере практически в три раза больше относительно Европейского Севера. Так, у мужчин азиатской территории 19 и 43% значений превышает референсную границу по отношению к 4 и 13% у населения европейской территории ($p=0,03$ и $0,004$), соответственно возрасту.

У мужчин Европейского Севера на фоне референсных значений дофамина в крови отмечены его положительные корреляционные взаимосвязи с уровнями ЛГ ($r = 0,70$; $p = 0,003$) и ДГЭА-С ($r = 0,76$; $p = 0,01$) в возрасте 22–44 лет и с уровнями свободного тестостерона ($r = 0,45$; $p = 0,04$) и ДГЭА-С ($r = 0,59$; $p = 0,005$) в возрасте старше 44 лет. Напротив, для мужчин Азиатского Севера корреляционных связей между содержанием дофамина и уровнями гормонов систем гипофиз – гонады в данной выборке не показано.

Регрессионный анализ показал прямое положительное влияние содержания дофамина на уровни ЛГ у мужчин Европейского Севера 22-44 лет, в соответствии с формулой (1):

$$\text{ЛГ} = 3,6 + 4,9 * \text{Дофамин} (R^2 = 0,27; p < 0,0035; DW = 1,3).$$

Содержание половых гормонов и дофамина в крови у мужчин Европейского и Азиатского Севера

Показатель, единицы	Европейский Север		Азиатский Север		Уровень значимости, p
	22-44 года,	45-60 лет,	22-44 года,	45-60 лет,	
	$n=57$	$n=64$	$n=31$	$n=29$	
	Me 10 %; 90 %	Me 10 %; 90 %	Me 10 %; 90 %	Me 10 %; 90 %	
Возраст, годы	34 (24; 43)	53 (46; 59)	33 (24; 43)	53 (48; 60)	
Дофамин, нмоль/л	0,32 (0; 0,699)	0,404 (0,298; 0,573)	0,616 (0,186; 0,853)	0,618 (0,263; 0,997)	$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-4} = 0,002$
ЛГ, МЕ/л	3,65 (1,55; 7,18)	5 (2,72; 10,95)	6,11 (2,89; 12,26)	5,36 (3,37; 10,08)	$p_{1-3} < 0,001$
ФСГ, МЕ/л	5,96 (3,52; 9,9)	7,27 (3,14; 13,4)	6 (3,4; 46,04)	6,09 (2,78; 16,4)	
Пролактин, нг/мл	10,04 (5,11; 37,7)	7,66 (3,83; 22,91)	11,67 (5,58; 29,09)	9,64 (5,24; 24,04)	$p_{2-4} = 0,044$
Прогестерон, нмоль/л	1,9 (0,8; 7,45)	2 (0,5; 7,24)	4,74 (2,48; 8,73)	4,61 (2,22; 6,42)	$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-4} = 0,003$
Тестостерон, нмоль/л	19,65 (10,8; 38,1)	17,12 (11,85; 33,1)	22,15 (1,27; 36,2)	14,32 (1,15; 35,8)	
Тестостерон св., нг/мл	15 (7,4; 33,7)	12,14 (4,1; 16,78)	12,29 (0,58; 18,06)	9,49 (0,4; 17,05)	$p_{1-3} = 0,014$
Эстрадиол, нмоль/л	0,14 (0,09; 0,28)	0,16 (0,11; 0,25)	0,2 (0,1; 0,3)	0,2 (0,1; 0,3)	$p_{2-4} = 0,004$
ДГЭА-С, мкмоль/л	6,4 (4,63; 9,96)	5,02 (2,3; 6,47)	5,88 (2; 10,43)	4,63 (2,04; 9,06)	
Тестостерон/эстрадиол	132,0 (53,03; 356,36)	112,18 (53,97; 233,0)	117,60 (6,20; 97,64)	68,00 (8,60; 188,20)	
СССГ, нмоль/л	36,9 (13,8; 68,3)	53,7 (15,4; 114,0)	82,6 (44,1; 121,4)	99,1 (54,0; 187,5)	$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$

Примечание. n – число обследуемых. Me – медиана значений; 10%-90% – перцентильный интервал; p – уровень значимости различий; p_{1-3} – достоверные различия между группой мужчин европейского и азиатского Севера в возрасте 22-44 лет; p_{2-4} – достоверные различия между группой мужчин европейского и азиатского Севера в возрасте 45-60 лет.

Обсуждение. Изменения содержания дофамина в крови могут являться причиной отклонений в работе различных звеньев эндокринной системы. Нами показано, что при более высоком содержании дофамина у мужского населения Азиатского Севера по сравнению с жителями Европейского Севера регистрируется более высокое содержание ЛГ, пролактина, прогестерона, эстрадиола и СССГ при снижении уровней свободного тестостерона, что показывает большее напряжение со стороны дофаминергической системы и системы гипоталамус-гипофиз-гонады. У мужчин Европейского Севера при более низких уровнях дофамина в крови выявлены корреляционные и регрессионные связи с показателями системы гипоталамус-гипофиз-гонады, что может свидетельствовать о возможном наличии стимулирующего влияния референсных уровней дофамина на стероидогенез. Следует отметить, что ранние исследования взаимодействия дофамина и гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы касались экспериментальных и клинических исследований. Достоинством работы является изучение возможных механизмов влияния различных уровней дофамина на систему гипоталамус-гипофиз-гонады у практически здоровой популяции мужчин, проживающих на Севере в условиях, отличающихся по степени экстремальности климата.

Полученные данные о значительном проценте лиц с высокими уровнями ЛГ и пролактина на фоне сходного процента лиц с низкими значениями свободных фракций тестостерона у мужчин Азиатского Севера может свидетельствовать либо о преждевременном снижении синтеза андрогенов, либо об активности их использования тканями и, как следствие, компенсаторном усилении гипоталамус-гипофизарной активности. Наличие высокого содержания прогестерона, который является предшественником для синтеза стероидных гормонов, свидетельствует, на наш взгляд, в большей степени, о наличии высоких резервов для синтеза половых гормонов в популяции мужчин Азиатского Севера.

Более высокий уровень пролактина у мужчин Азиатского Севера может быть компенсаторной реакцией на снижение в крови уровней андрогенов. Так, есть данные, что пролактин повышает количество рецепторов к ЛГ [21] и в физиологических концентрациях способствует выработке тестостерона [22]. В то же время, повышенный уровень пролактина, который встречается у части обследованных лиц, вызывает угнетение тестикулярного андрогенопоэза [23, 24]. Изучение проблемы соотношения уровней пролактина и периферических половых гормонов у разных групп населения Арктики представляет отдельный интерес в рамках экологической физиологии и превентивной медицины.

Повышение эстрадиола у мужского населения Севера, особенно у жителей Азиатского Севера, может быть связано с усилением ароматизации тестостерона в эстрадиол при более высоких уровнях дофамина [25] и вовлечением эстрадиола в механизмы поддержания активности щитовидной железы [26].

Отличительной чертой содержания СССГ является более высокий его уровень у представителей Азиатского Севера относительно населения Европейского

Севера, что может объясняться способностью тиреоидных гормонов, активность которых на азиатской территории повышена [27], стимулировать продукцию СССГ печенью, снижая при этом эффективность действия половых стероидов [28]. Повышенные концентрации СССГ могут приводить к снижению биодоступности эстрадиола, что повышает риск переломов бедренной кости и тел позвонков [29, 30], а также сообщается об ассоциированном повышении риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин [18]. Снижение уровня свободного тестостерона также может быть связано с повышением уровня секс-стероидсвязывающего глобулина [31]. Однако, нельзя не отметить тот факт, что более высокое содержание СССГ у населения Азиатского Севера может также являться компенсаторной реакцией, направленной на сохранение резерва половых гормонов в экстремальных условиях среды. Данный показатель может служить как критерием адаптационных, так и дизадаптационных реакций у населения северных территорий и основой для разработки превентивных мероприятий, направленных на укрепление репродуктивного здоровья населения.

Заключение. Новым и актуальным фактом является регистрация более высоких уровней дофамина, ЛГ, прогестерона, пролактина, эстрадиола, СССГ при снижении уровней свободных фракций тестостерона у жителей Азиатского Севера по сравнению с мужчинами Европейского Севера. Референсные уровни дофамина у мужчин Европейского Севера сочетаются со стимулирующим эффектом дофамина на уровни ЛГ, что может способствовать усилению стероидогенеза половых гормонов. Более высокие уровни дофамина у мужчин Азиатского Севера сочетаются с увеличением уровней эстрадиола, что может быть связано с влиянием дофамина на ароматизацию тестостерона. Следовательно, отдельный регион, имеющий экологические различия, характеризуется наличием особенностей компенсаторно-приспособительных реакций со стороны дофаминергической системы и системы гипоталамус-гипофиз-гонады. Выявленные особенности могут помочь в проведении превентивных мероприятий, направленных на сохранение мужского репродуктивного потенциала жителей Арктических территорий.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 1-18, 21-23, 25, 26, 28-31
см. REFERENCES)

19. Типисова Е.В., Горенко И.Н., Попкова В.А., Попов А.И., Андронов С.В. Соотношение дофамина, половых гормонов, антиспермальных антител, секс-стероид-связывающего глобулина, цАМФ у коренного и местного мужского населения арктической зоны РФ. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2018; 15(2): 218-28. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-2-218-228.
20. Горенко И.Н. Частота регистрации повышенных уровней дофамина и взаимосвязи с половыми гормонами у мужчин Европейского Севера. *Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Медико-биологические науки*. 2014; 2: 21-9.
24. Логинов П.В., Николаев А.А., Тёплый Д.Л. Эндокринные изменения у мужчин, подверженных воздействию неблагоприятных факторов. *Естественные науки*. 2015; 4 (53): 83-9.

27. Горенко И.Н., Типисова Е.В., Попкова В.А., Елфимова А.Э. Отношение гормонов гипофизарно-тиреоидной системы, дофамин и цАМФ у жителей Европейского и Азиатского севера. *Журнал медико-биологических исследований*. 2019; 7(2): 140-50. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.2.140.

REFERENCES

1. Sengupta P., Borges E.J., Dutta S., Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Hum. Exp. Toxicol.* 2018; 37(3): 247-55. DOI: 10.1177/0960327117703690.
2. Adewoyin M., Ibrahim M., Roszaman R., Isa M.L.M., Alewi N.A.M., Rafa A.A.A. et al. Male Infertility: The effect of natural antioxidants and phytochemicals on seminal oxidative stress. *Diseases*. 2017; 5(1): 9. DOI: 10.3390/diseases5010009.
3. Weihe P., Debes F., Halling J., Petersen M.S., Muckle G., Odland J.Q. et al. Health effects associated with measured levels of contaminants in the Arctic. *Int. J. Circumpolar. Health*. 2016; 75: 33805. DOI: 10.3402/ijch.v75.33805.
4. Osadchuk L., Shantanova L., Troev I., Kleshchev M., Osadchuk A. Regional and ethnic differences in semen quality and reproductive hormones in Russia: A Siberian population-based cohort study of young men. *Andrology*. 2021; 9: 1512-25. DOI: 10.1111/andr.13024.
5. Osadchuk L., Tipisova E., Kleshchev M., Gorenko I., Osadchuk A. Study of semen quality, reproductive hormone levels, and lipid levels in men from Arkhangelsk, a city in North of European Russia. *Am. J. Mens. Health*. 2020; 14(4): 1557988320939714. DOI: 10.1177/1557988320939714.
6. Moraes M.M., Bruzzi R.S., Martins Y.A.T., Mendes T.T., Maluf C.B., Ladeira R.V.P. et al. Hormonal, autonomic cardiac and mood states changes during an Antarctic expedition: From ship travel to camping in Snow Island. *Physiol Behav*. 2020; 224: 113069. DOI: 10.1016/j.physbeh.2020.113069.
7. Moiseyenko Y.V., Sukhorukov V.I., Pyshnov, G.Y., Mankovska I.M., Rozova K.V., Miroshnychenko O.A. et al. Antarctica challenges the new horizons in predictive, preventive, personalized medicine: preliminary results and attractive hypotheses for multi-disciplinary prospective studies in the Ukrainian "Akademik Vernadsky" station. *EPMA Journal*. 2016; 7: 11. DOI: 10.1186/s13167-016-0060-8.
8. Tsubulnikov S., Maslov L., Voronkov N., Oeltgen P. Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones*. 2020; 19: 329-39. DOI: 10.1007/s42000-020-00200-2.
9. Maslov L.N., Vychuzhanova E.A. The role of the sympathoadrenal system in adaptation to cold. *Neurosci. Behav. Physiol*. 2016; 46(5): 589-600. DOI: 10.1007/s11055-016-0283-0.
10. Hervet T., Teresin'ski G., Hejna P., Descloux E., Grouzmann E., Palmiere C. Catecholamines and their O-methylated metabolites in vitreous humor in hypothermia cases. *Forensic. Sci. Med. Pathol*. 2016; 12: 163-9. DOI: 10.1007/s12024-016-9764-2.
11. Xing L., McDonald H., Da Fonte D.F., Gutierrez-Villagomez J.M., Trudeau V.L. Dopamine D1 receptor activation regulates the expression of the estrogen synthesis gene aromatase B in radial glial cells. *Front Neurosci*. 2015; 9: 310. DOI: 10.3389/fnins.2015.00310.
12. Yuxin L., Chen L., Xiaoxia L., Yue L., Junjie L., Youzhu L. et al. Research progress on the relationship between obesity-inflammation-aromatase axis and male infertility. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021; 6612796. DOI: 10.1155/2021/6612796.
13. Damián J., Bausero M., Bielli A. Acute stress, hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis and testicular function – a review. *Annals of Animal Science*. 2015; 15(1): 31-50. DOI: 10.2478/aoas-2014-0084.
14. Gragnoli C., Reeves G., Reazer J., Postolache T.T. Dopamine–prolactin pathway potentially contributes to the schizophrenia and type 2 diabetes comorbidity. *Transl Psychiatry*. 2016; 6: e785. DOI: 1038/tp.2016.50.
15. Shin S.H., Song G.H., Ross G.M. Regulation of prolactin secretion: Dopamine is the prolactin release inhibiting factor (PIF), but also plays a role as a releasing factor (PRF). *Korean Journal of Biological Sciences*. 1999; 3(2): 103-13. DOI: 10.1080/12265071.1999.9647472.
16. Ciechanowska M., Apot M., Paruszevska E., Radawiec W., Przekop F. The influence of dopaminergic system inhibition on biosynthesis of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in anoestrous sheep; hierarchical role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 (RFPR-3). *Reprod. Fertil. Dev*. 2018; 30(4): 672-80. DOI: 10.1071/RD16309.
17. Li J., Hou W., Lin S., Wang L., Pan C., Wu F. et al. Polydopamine Nanoparticle-Mediated Dopaminergic Immunoregulation in Colitis. *Adv Sci (Weinh)*. 2022; 9(1): e2104006. DOI: 10.1002/advs.202104006.
18. Gyawali P., Martin S., Heilbronn L., Vincent A.D., Jenkins A.J., Januszewski A.S. et al. Higher serum sex hormone-binding globulin (SHBG) levels are associated with incident cardiovascular disease (CVD) in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2019; 104(12): 6301-15. DOI: 10.1210/je.2019-01317.
19. Tipisova E.V., Gorenko I.N., Popkova V.A., Popov A.I., Andronov S.V. The correlation of dopamine, sex hormones, antisperm antibodies, sex hormone binding globuline, cAMP in aboriginal and local male population of the Arctic Zone of the RF. *Vestnik Ural'skoy Meditsinskoy Akademicheskoy Nauki*. 2018; 15(2): 218–28. (in Russian)
20. Gorenko I.N. Frequency of elevated dopamine levels and its relationship with sex hormones in men from the European North. *Vestnik Severnogo (Arkticheskogo) Federal'nogo Universiteta. Seriya "Meditsinskie i biologicheskie nauki"*. 2014; 2: 21-9. (in Russian)
21. Raut S., Deshpande S., Balasnor N.H. Unveiling the role of prolactin and its receptor in male reproduction. *Horm. Metab. Res*. 2019; 51(4): 215-9. DOI: 10.1055/a-0859-1144.
22. O'Hara L., Curley M., Tedim Ferreira M., Cruickshanks L., Milne L., Smith L.B. Pituitary androgen receptor signalling regulates prolactin but not gonadotrophins in the male mouse. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0121657. DOI: 10.1371/journal.pone.0121657.
23. Fiala L., Lenz J., Sajdlova R. Effect of increased prolactin and psychosocial stress on erectile function. *Andrologia*. 2021; e14009. DOI: 10.1111/and.14009.
24. Loginov P.V., Nikolaev A.A., Teply D.L. Endocrine changes in men exposed to the influence of adverse factors. *Estestvennye nauki*. 2015; 4 (53): 83-9. (in Russian)
25. Xing L., Esau C., Trudeau V.L. Direct regulation of aromatase b expression by 17β-estradiol and dopamine D1 receptor agonist in adult radial glial cells. *Front Neurosci*. 2015; 9: 504. DOI: 10.3389/fnins.2015.00504.
26. Kordí F, Khazali H. The effect of ghrelin and estradiol on mean concentration of thyroid hormones. *Int. J. Endocrinol. Metab*. 2015; 13(1): e17988. DOI:10.5812/ijem.17988.
27. Gorenko I.N., Tipisova E.V., Popkova V.A., Elfimova A.E. Ratios of the hormones of the pituitary-thyroid axis, dopamine and camp in residents of the European and Asian North of Russia. *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2019; 7(2): 140-50. DOI: 10.17238/issn2542-1298.2019.7.2.140. (in Russian)
28. Simó R., Sáez-López C., Barbosa-Desongles A., Hernández C., Selva D.M. Novel insights in SHBG regulation and clinical implications. *Trends. Endocrinol. Metab*. 2015; 26(7): 376-83. DOI: 10.1016/j.tem.2015.05.001.
29. Antonio L., Wu F.C., O'Neill T.W., Pye S.R., Ahern T.B., Laurent M.R. et al. Low free testosterone is associated with hypogonadal signs and symptoms in men with normal total testosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2016; 101(7): 2647-57. DOI: 10.1210/je.2015-4106.
30. Tsang G., Insel M.B., Weis J.M., Morgan M.A., Gough M.S., Frasier L.M. et al. Bioavailable estradiol concentrations are elevated and predict mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit. Care*. 2016; 20(1): 335. DOI: 10.1186/s13054-016-1525-9.
31. Winters S.J. SHBG and total testosterone levels in men with adult onset hypogonadism: what are we overlooking? *Clin. Diabetes Endocrinol*. 2020; 6(17). DOI: 10.1186/s40842-020-00106-3.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Алексанин С.С.¹, Алхутова Н.А.¹, Жижина О.Л.², Ковязина Н.А.¹, Нестеренко Н.В.³, Рыбников В.Ю.¹

ЛАБОРАТОРНЫЕ МАРКЕРЫ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ АРКТИКИ: НАУЧНЫЙ ПОИСК И ПЕРСПЕКТИВЫ ВНЕДРЕНИЯ

¹Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский медико-социальный институт, 195271, Санкт-Петербург, Россия;

³Управление медико-психологического обеспечения МЧС России, 121357, Москва, Россия

Комплекс климатогеографических условий Арктики обуславливает высокую интенсивность полисистемного адаптивного ответа организма, на продолжительность которого дополнительно оказывают влияние индивидуальные генетические особенности, социальные условия, психологические и рабочие нагрузки. С учетом актуальности своевременной профилактики и ранней диагностики стресс-индуцированной соматической патологии у сотрудников МЧС, работающих в неблагоприятных климатогеографических зонах, авторы оценили информативность определения уровня стероидных гормонов и инсулина в качестве лабораторных маркеров адаптации к условиям Арктики. Обоснована целесообразность разработки объективных критериев интерпретации индекса инсулин/кортизол и изучения информативности уровня 17ОН-прогестерона в качестве маркера ранних процессов адаптации к неблагоприятным климатогеографическим условиям Арктики.

Ключевые слова: Арктика; адаптивный ответ; индекс ДГЭАС/кортизол; индекс инсулин/кортизол; 17ОН-прогестерон; маркеры адаптации.

Для цитирования: Алексанин С. С., Алхутова Н.А., Ковязина Н. А., Жижина О.Л., Нестеренко Н.В., Рыбников В.Ю. Лабораторные маркеры адаптации к условиям Арктики: научный поиск и перспективы внедрения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 267-270. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-267-270>

Для корреспонденции: Ковязина Надежда Алексеевна, канд. мед. наук, зав. лаб. серологических исследований и аллергодиагностики отдела лабораторной диагностики; e-mail: nakovzn@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.11.2021

Принята к печати 16.03.2022

Опубликовано 21.05.2022

Aleksanin S.S.¹, Alkhutova N.A.¹, Kovyazina N.A.¹, Zhizhina O.L.², Nesterenko N.V.³, Rybnikov V.Yu.¹

LABORATORY MARKERS OF ADAPTATION TO ARCTIC CONDITIONS: SCIENTIFIC SEARCH AND PROSPECTS OF IMPLEMENTATION.

¹NRCERM, EMERCOM of Russia, Saint-Petersburg, Russia;

²Saint-Petersburg Medical and Social Institute;

³Department of Medical and Psychological Support, EMERCOM of Russia, Moscow, Russia

The complex of climatic and geographical conditions of the Arctic determines the high intensity of the polysystem adaptive response of the organism, the duration of which is additionally influenced by individual genetic characteristics, social conditions, psychological and work loads. Taking into account the relevance of timely prevention and early diagnosis of stress-induced somatic pathology in EMERCOM employees working in unfavorable climatic and geographical zones, the authors evaluated the informative value of determining the level of steroid hormones and insulin as laboratory markers of adaptation to Arctic conditions. The expediency of developing objective criteria for the interpretation of the insulin/cortisol index and studying the informativeness of the 17ONprogesterone level as the earliest marker of adaptation to unfavorable climatic and geographical conditions of the Arctic is substantiated

Key words: Arctic, adaptive response, DHEAS/cortisol index, insulin/cortisol index, 17ON-progesterone, adaptation markers.

For citation: Aleksanin S.S., Alkhutova N.A., Kovyazina N.A., Zhizhina O.L., Nesterenko N.V., Rybnikov V.Yu. Laboratory markers of adaptation to Arctic conditions: scientific search and prospects of implementation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 267-270 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-267-270>

For correspondence: Kovyazina N.A., Cand. Sci.Med.; e-mail: nakovzn@gmail.com

Information about authors:

Aleksanin S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6998-1669>;

Alkhutova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-6268-8969>;

Kovyazina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0482-0802>;

Zhizhina O.L., <https://orcid.org/0000-0003-2247-2319>;

Nesterenko N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0066-9500>;

Rybnikov V.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5527-9342>.

Conflict of interests. The author declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 10.11.2021

Accepted 16.03.2022

Published 21.05.2022

Введение. Комплекс климатогеографических условий Арктики обуславливает высокую интенсивность полисистемного адаптивного ответа организма, на продолжительность которого дополнительно оказывают влияние индивидуальные генетические особенности, социальные условия, психологические и рабочие нагрузки [1,2]. Известно, что истощение адаптационных резервов на фоне длительного воздействия стрессовых факторов проявляется системной дезинтеграцией и ассоциировано с увеличением риска развития соматической патологии, в том числе за счет катаболических эффектов глюкокортикоидов и катехоламинов. В ходе адаптации к условиям Севера ведущим механизмом мобилизации энергетических ресурсов служит переключение «углеводного» типа метаболизма на «белково-липидный», которое проявляется снижением уровня инсулина в крови на фоне относительно высокой концентрации кортизола. В связи с этим, для оценки напряженности процессов катаболизма предложено использовать расчет соотношения концентрации кортизола и инсулина [3].

Нами было принято во внимание, что применение лабораторных индексов обладает рядом диагностических преимуществ, особенно ценных в аспекте персонификации медицины и актуальности ранней диагностики заболеваний. Так, расчет соотношения концентраций взаимозависимых показателей позволяет определить согласованность адаптационных процессов, свойственную здоровью, и выявить их дезинтеграцию, характерную для болезни. В то же время стандартизация процессов определения концентрации каждого из компонентов лабораторного индекса обуславливает приемлемый уровень их аналитической точности. Сочетание этих преимуществ способствует достижению более высокой клинической чувствительности диагностики без ущерба ее клинической специфичности. Однако, перспективы разработки критериев интерпретации и внедрения в медицину новых интегрированных лабораторных показателей определяются интенсивностью взаимодействия между лабораторией и клиникой, поскольку в их основе лежат результаты научно-практических поисковых работ. Также, важным аспектом успеха нового клинического применения привычных лабораторных тестов является включение в образовательные программы для студентов медицинских ВУЗов и врачей клинических специальностей профессиональной информации о современных технологических и методических возможностях лаборатории, а также о различных (индивидуальном медицинском и стандартном био-статистическом) подходах к формированию референтных значений. Расширение паттерна постаналитической оценки особенно важно для тех анализов, для которых характерна высокая межиндивидуальная и индивидуальная биологическая вариация и, соответственно – широкий популяционный референтный диапазон. Например, известно, что универсальным механизмом адаптации является переключение стероидогенеза в надпочечниках с продукции глюкокортикоидов на секрецию андрогенов, в частности, ДГЭАС [4], обеспечивающее функциональное равновесие анаболических и катаболических процес-

сов и характеризующее стадии адаптивного ответа. Однако, большой размах референтных значений для этих показателей служит причиной недостаточной клинической чувствительности определения ДГЭАС и кортизола в качестве ранних маркеров адаптации. Во ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России на основании собственных результатов научных исследований был разработан способ объективной оценки адаптационных резервов с расчетом индекса ДГЭАС/кортизол [5]. Использование индекса позволило повысить клиническую чувствительность диагностики истощения резервов адаптации у сотрудников МЧС России, проходивших плановое обследование в 2017 г., а 71% по сравнению с отдельным определением концентрации ДГЭАС и кортизола. К настоящему времени индекс уже активно используется врачами клинических подразделений стационара и поликлиники ВЦЭРМ для объективной оценки состояния здоровья мужчин, в алгоритмах лечебно-диагностических и медико-профилактических обследований сотрудников МЧС России. Этот путь от научных предпосылок до внедрения нового лабораторного теста обсуждается в ходе теоретических и практических занятий со студентами по программам «Факультетская терапия» и «Госпитальная терапия с курсом эндокринологии» для демонстрации «живого», готового к дальнейшему развитию, статуса современной клинико-лабораторной диагностики и в качестве способа совершенствования ранней диагностики и профилактики заболеваний.

При планировании настоящего исследования нами было дополнительно учтено, что стероидный гормон прогестерон также обладает адаптогенными свойствами и выступает в роли антагониста кортизола [3,4]. При этом известно, что в ходе стероидогенеза в надпочечниках прогестерон является предшественником как кортизола и альдостерона («гормонов стресса»), так и андростендиона (А4), обладающего адаптивным анаболическим эффектом. Общим для кортизола и А4 предшественником служит первичный метаболит прогестерона – 17ОН-прогестерон. Напротив, обладающий выраженными адаптивными свойствами ДГЭАС синтезируется без участия прогестерона, но также служит предшественником А4 и тестостерона.

Цель исследования – оценить информативность определения уровня стероидных гормонов и инсулина в качестве лабораторных маркеров адаптации к условиям Арктики с учетом актуальности своевременной профилактики и ранней диагностики стрессиндуцированной соматической патологии у сотрудников МЧС России, работающих в неблагоприятных климато-географических зонах.

Материал и методы. Материалом для исследования служила сыворотка крови практически здоровых 74 мужчин, сотрудников МЧС России, от 22 до 49 лет (33,1±0,78), работающих в условиях Арктики. Настоящее исследование было частью комплексного медицинского обследования, включающего, помимо лабораторного, также и другие методы оценки объективного соматического и психологического статуса. Дизайн исследования имел форму научного поиска с доступом ко всему комплексу полученных данных.

Указаны материалы и методы получения результатов, от которых докладывается в статье.

Определение концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата, кортизола, прогестерона, инсулина, андростендиона, пролактина выполнены с использованием иммунохемилюминесцентного автоматического анализатора закрытого типа «ИММУЛАЙТ ХРi» (Siemens, Германия). Результаты измерений концентрации были получены в одной аналитической серии, в условиях воспроизводимости. Удовлетворительная правильность методов подтверждалась участием в системе внешней оценки качества EQAS. Для измерения уровня 17ОН-прогестерона и альдостерона пользовались иммуноферментным методом и соответствующими системами реагентов DRG (Германия). Уровень глюкозы и триглицеридов определяли на биохимическом анализаторе DxC-600 с реактивами производителя оборудования (Beckman Coulter, США). Референсные сведения указаны в таблице. Значение индекса ДГЭАС/кортизол интерпретировали следующим образом: < 1.1 – адаптационные резервы истощены; от 1.1 до 2.1 – адаптационные резервы расходуются; > 2.1 – адаптационные резервы сохранены. Значение индекса инсулин/кортизол оценивали по отношению к референсной медиане, которая была рассчитана как частное медиан референсных диапазонов для инсулина и кортизола и составила 2.5.

Обработку результатов проводили при помощи лабораторной информационной системы qLIS «СПАРМ». Статистическую обработку результатов

проводили с помощью программ «Excel-2000» и «Statistica 10.0». Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Значимость различий при парных сравнениях оценивали с помощью Т-критерия Вилкоксона – Коновалова и U – критерия Манна-Уитни. Для сравнения полученных данных использовали критерий Краскела-Уоллиса. Данные в тексте и таблице представлены в виде $M \pm m$ [q25; q75], Me (M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней арифметической, Me – медиана, q – квартиль). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Уровни кортизола и ДГЭАС в сыворотке крови всех 74 мужчин находились в пределах референсного диапазона. Индекс ДГЭАС/кортизол составил $2,47 \pm 0,28$ и только у четырех обследованных был равен или ниже 1.1. Таким образом, у 95% обследованных мужчин не было выявлено истощения адаптационных резервов, что соответствует их относительно молодому возрасту и оценке состояния здоровья. Тем не менее, медиана значений индекса инсулин/кортизол составила 1.5 и была ниже референсной медианы для этого показателя, при этом концентрация инсулина в крови была ниже референсного диапазона у 27 из 74 мужчин (36%). Полученные данные позволяют предположить относительное усиление процессов катаболизма по пути переключения «углеводного» типа обмена на «белково-липидный», несмотря на благоприятный фон концентрации кор-

Уровень надпочечниковых стероидов и некоторых биохимических показателей крови в группах, сформированных в зависимости от уровня 17-ОН прогестерона

Показатель	Референсные значения		Группа 1		Группа 2	
	диапазон	медиана				
17-ОН прогестерон, нмоль/л	1,51-6,35	4,0	<4,0		> 4,0	
<i>n</i>	-	-	45		29	
Структурные средние	-	-	$M \pm m$	Me[q25;q75]	$M \pm m$	Me[q25;q75]
Возраст, годы	-	-	32,0 \pm 1,09	32,0 [28,0;35,0]	33,84 \pm 1,11	33,5 [28,0;39,25]
Индекс массы тела,	< 25	-	26,32 \pm 0,44	26,16 [24,8;28,41]	25,15 \pm 0,53	25,18 [23,04;26,42]
Альдостерон, пмоль/л	40-650	161	219,07 \pm 20,14*	184,5[133,5;243,25]	165,8 \pm 13,56*	138[112;209]
Андростендион, нмоль/л	2,4-12,6	6,3	8,91 \pm 0,5*	8,35[6,58;10,43]	6,49 \pm 0,6*	6,1[4,6;8,0]
Пролактин, мМЕ/л	53 – 360	131	172,54 \pm 12,78*	156[111,25;206,5]	132,5 \pm 9,55*	123[96;157]
ДГАЭС, мкмоль/л	2,20 –15,20	7,6	7,39 \pm 0,39	6,95[5,65;8,3]	7,39 \pm 0,59	7,0[4,7;8,6]
Тестостерон, нмоль/л	7,0 – 28,0	11,3	12,22 \pm 0,64	11,95[9,58;15,2]	12,34 \pm 0,66	11,9[9,6;14,9]
ДГАЭС/кортизол	> 2,1	-	2,52 \pm 0,19	2,19[1,45;2,94]	2,39 \pm 0,15	2,31[1,84;3,06]
Прогестерон, нмоль/л	0,86 – 2,9	1,7	0,97 \pm 0,06	0,8[0,60;1,2]	1,15 \pm 0,09	1,1[0,8;1,4]
Кортизол, нмоль/л	185 – 624	370	333,7 \pm 16,5	307,9[248,3;398,8]	215,3 \pm 17,5	304,7[241,2;385,3]
Триглицериды, ммоль/л	0,6 – 2,28	1,4	1,6 \pm 1,18*	1,22[0,74; 2,29]	1,07 \pm 0,12*	0,90[0,60;1,21]
Глюкоза, моль/л	3,5 – 5,8	4,7	5,04 \pm 0,08	5,0[4,63;5,23]	4,83 \pm 0,1	4,8[4,46;5,23]
Инсулин, мМЕ/л	6,0- 29,0	9,3	9,92 \pm 1,5*	5,60 [2,68;11,83]	5,35 \pm 1,0*	3,95 [2,0;5,2]
Инсулин/кортизол	-	2,5	2,92 \pm 0,41*	2,23 [1,08;3,55]	1,75 \pm 0,28*	1,27 [0,77;1,69]
id НОМА	< 2,7	-	2,29 \pm 0,37*	1,26[0,64;2,62]	1,15 \pm 0,22*	0,90[0,42;1,16]

Примечание. *- $p < 0,05$ между группами.

тизола. Наши результаты согласуются с результатами исследования В.А. Попковой [3], в котором при обследовании мужчин, жителей Архангельска, также было выявлено смещение диапазона концентраций инсулина в сторону нижнего референсного предела на фоне «нормальных» значений уровня кортизола. Авторы также сообщили [3] о смещении уровня прогестерона относительно референсной медианы в обследованной группе. В нашем исследовании у 26 из 74 обследованных мужчин (35%) уровень прогестерона в крови был ниже референсного диапазона. Однако, при разделении обследованных мужчин на группы в зависимости от уровня прогестерона, различий по другим объективным показателям лабораторного и соматического статуса выявить не удалось.

В то же время разделение обследованных мужчин в зависимости от уровня 17-ОН прогестерона оказалось более информативным. Были сформированы: 1-я группа (уровень < 4,0 нмоль/л – ниже медианы референсного диапазона) и 2-я группа (уровень > 4,0 нмоль/л – выше медианы референсного диапазона). Значения индекса ДГЭАС/кортизол в обеих группах были сопоставимы (см. таблицу). Тем не менее, у мужчин в 1-й группе были выявлены более высокие концентрации А4 и альдостерона, а также пролактина. Между тем, известно, что увеличение концентрации альдостерона характерно для начальной стадии стресс-ответа в качестве компонента адаптивного механизма повышения артериального давления, в то время как пролактин является стимулятором продукции половых стероидов в коре надпочечников в ходе адаптации к стрессу [4]. По возрасту и значениям индекса массы тела группы были сопоставимы. Однако следует отметить, что в 1-й группе значения концентрации инсулина были выше, чем во 2-й группе, а диапазон значений уровня триглицеридов и индекса НОМА был смещен к верхней границе референсного диапазона. Соотношение концентраций инсулина и кортизола также было выше в 1-й группе, в которой медиана этого показателя была сопоставима с референсной. Перечисленные особенности гормонального статуса мужчин, вошедших в 1-ю группу, могут быть рассмотрены как в аспекте «положительной» противовесной активации анаболических механизмов, так и с позиции формирования инсулинорезистентности, как негативного эффекта глюкокортикоидов [6]. Полученные лабораторные данные позволяют предположить, что в 1-й группе интенсивность ранних механизмов стрессорной реакции была выше, что проявилось более высокими значениями альдостерона, А4, инсулина и пролактина. Кроме того, наличие статистически значимых различий в уровне индекса инсулин/кортизол между группами, сформированными в зависимости от уровня 17-ОН прогестерона, подтверждает представление о системном, но многофакторном характере адаптивного ответа. При этом клиническая информативность определения отдельных и интегрированных лабораторных показателей

гормонального статуса еще требует дальнейшего всестороннего изучения.

Заключение. Полученные нами данные о понижении соотношения уровней инсулина и кортизола у мужчин, работающих в условиях Арктики, согласуются с результатами исследований, опубликованных другими авторами [3]. Следовательно, целесообразна разработка объективных критериев интерпретации индекса инсулин/кортизол в качестве маркера адаптации.

Результаты исследования позволяют рассматривать концентрацию 17-ОН прогестерона в качестве маркера ранних процессов адаптации и определяют актуальность проведения дальнейших научных исследований для установления его клинической значимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Проблемы здравоохранения и социального развития Арктической зоны России. Дегтева Г.Н., ред. М.:Paulsen; 2011. (Вклад России в Международный полярный год 2007/08). ISBN 9785987970492.
2. Гора Е.П. Экология человека: Учебное пособие для вузов. М.: Дрофа; 2007.
3. Попкова В.А. Анализ изменения эндокринного профиля жителей города Архангельска в течение 20 лет. *Современные проблемы науки и образования* [Электронный ресурс]. 2019; 6. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29398>. Дата обращения 20 сентября 2021.
4. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Общая патофизиология (с основами иммунопатологии): Патофизиология. В 3-х томах. Изд. 4-е. СПб: ЭЛБИ-СПб; 2008. ISBN 9785939790314.
5. Алхутова Н.А., Ковязина Н.А. Способ оценки адаптационных резервов организма человека. Патент РФ № 2679906; 2019.
6. Селятицкая В.Г. Глюкокортикоидные гормоны: от процессов адаптации к экологическим факторам Севера до метаболических нарушений при диабете. *Бюллетень Сибирского отделения РАМН*. 2012; 32 (1): 13-20.

REFERENCES

1. Problems of health and social development of the Arctic zone of Russia. Russia's contribution to the International Polar Year 2007/08 [Problemy zdoravookhraneniya i social'nogo razvitiya Arkticheskoy zony Rossii]. Degteva G. N., ed. Moscow: Paulsen; 2011. ISBN 9785987970492. (in Russian)
2. Gora E.P. Human ecology [Ekologiya cheloveka]. Moscow: Drofa; 2007. (in Russian)
3. Popkova V.A. Analysis of change in the endocrine profile in residents of Arkhangelsk for 20 years. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019; 6. Available from: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29398>. (accessed 20 September 2021). (in Russian)
4. Zaichik A. Sh., Churilov L.P. General pathophysiology (with the basics of immunopathology) [Obshchaya patofiziologiya (s osnovami immunopatologii)]. Patofiziologiya. In 3 vol. 4th ed. St.Petersburg: ELBI-SPb; 2008. ISBN 9785939790314. (in Russian)
5. Alkhutova N.A., Kovyazina N.A. The method for assessing the adaptive reserves of the human body. Patent RF № 2679906; 2019. (in Russian)
6. Selyatitskaya V.G. Glucocorticoid hormones from adaptation processes to northern ecology factors up to metabolic disturbances at diabetes. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2012; 32 (1): 13-20. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Усманова З.А.¹, Розиходжаева Г.А.², Арипов А.Н.¹

СРАВНЕНИЕ УРОВНЯ ЦИНКА В РАЗЛИЧНЫХ БИОСУБСТРАТАХ БОЛЬНЫХ С НЕСТАБИЛЬНЫМИ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМИ БЛЯШКАМИ

¹ Центр развития профессиональной квалификации медицинских работников Минздрава Республики Узбекистан, 100007, Ташкент, Узбекистан;

² Центральная клиническая больница №1 Главного медицинского управления при Администрации Президента Республики Узбекистан, 100143, Ташкент, Узбекистан

В статье рассмотрены содержание и сравнительная характеристика уровня цинка в волосах, биоптатах каротидных атеросклеротических бляшек (АСБ) и сыворотке крови у больных с атеросклерозом сонных артерий. Самая высокая концентрация цинка обнаружена в волосах, по сравнению с АСБ и сывороткой крови. Уровень цинка выше в АСБ, чем в сыворотке. Заслуживает внимания тот факт, что уровень ионов цинка в биоптатах нестабильных АСБ был ниже, по сравнению с уровнем ионов цинка в волосах.

Ключевые слова: цинк; сыворотка крови; волосы; атеросклеротические бляшки сонной артерии; каротидный атеросклероз.

Для цитирования: Усманова З.А., Розиходжаева Г.А., Арипов А.Н. Сравнение уровня цинка в различных биосубстратах больных с нестабильными атеросклеротическими бляшками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 271-276. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-271-276>

Для корреспонденции: Усманова Захро Абдувалиевна, PhD, ассистент каф. клин. лаб. диагностики; e-mail: zahro.usmanova@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 05.12.2021

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 21.05.2022

Usmanova Z.A.¹, Rozikhodjaeva G.A.², Aripov A.N.¹

COMPARISON OF ZINC LEVELS IN THE VARIOUS BIOSUBSTRATES OF PATIENTS WITH UNSTABLE ATHEROSCLEROTIC PLAQUE

¹ Center for the development of professional qualifications of medical workers, 100007, Tashkent, Uzbekistan;

² Clinical Hospital №1 of the Head Medical Department under the Administration of the of the President of the Republic of Uzbekistan, 100143, Tashkent, Uzbekistan

The article describes the content and comparative characteristics of zinc level in the hair, biopsies of carotid atherosclerotic plaques (AP) and serum in patients with carotid atherosclerosis. The highest concentration of zinc is found in hair compared to the AP and serum. Zinc levels is higher in AP than in the serum. It is noteworthy that the level of zinc in biopsies of unstable AP was lower compared to the level of zinc in hair.

Key words: zinc of the serum; hair; atherosclerotic plaques of carotid artery; carotid atherosclerosis.

For citation: Usmanova Z.A., Rozikhodjaeva G.A., Aripov A.N. Comparison of zinc levels in the various biosubstrates of patients with unstable atherosclerotic plaque. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 271-276 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-271-276>

For correspondence: Usmanova Z.A., PhD, assistant of department of Clinical laboratory diagnostics; e-mail: zahro.usmanova@yandex.ru

Information about authors:

Usmanova Z.A., <https://orcid.org/0000-0002-2701-5398>;

Rozikhodjaeva G.A., <https://orcid.org/0000-0003-1291-9375>;

Aripov A.N., <https://orcid.org/0000-0002-5058-0918>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 05.12.2021

Accepted 25.01.2022

Published 21.05.2022

Важнейшим микроэлементом, необходимым для активации более 300 металлосодержащих ферментов, является цинк (Zn) [13]. Он входит в состав многих белков, регулирующих уровень транскрипции и биосинтеза нуклеиновых кислот и протеинов, обеспечивает контроль экспрессии генов в процессе пролиферации и дифференцировки клеток. По данным многих

авторов установлена взаимосвязь между содержанием цинка в организме и развитием ожирения, сахарного диабета 2 типа, атеросклероза, гипертонической болезни и ишемической болезни сердца (ИБС) [24]. При этих заболеваниях дефицит Zn отмечен в различных биосубстратах: сыворотке крови, эритроцитах, волосах [2]. Одновременное изучение концентрации

цинка в волосах, биоптатах каротидных атеросклеротических бляшек и сыворотке у больных ишемической болезнью сердца с каротидным стенозом до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования - сравнить содержание цинка в волосах, биоптатах атеросклеротических бляшек сонной артерии и сыворотке крови у пациентов с выраженным стенозом сонных артерий.

Материал и методы. В исследование были включены 30 больных ИБС, имеющих выраженные нестабильные атеросклеротические поражения сонных артерий в возрасте от 47 до 76 лет (27 мужчин и 3 женщины) (средний возраст $62,23 \pm 1,18$ лет). Критериями исключения из исследования явились острый инфаркт миокарда, кардиомиопатии, острый миокардит, перикардит, острое нарушение мозгового кровообращения, злокачественные опухоли, диффузные заболевания соединительной ткани, острые инфекционные заболевания, пневмофиброз и тяжелая хроническая обструктивная болезнь легких.

Всем пациентам проведено цветное дуплексное сканирование внечерепных отделов брахиоцефальных артерий на ультразвуковом сканере HD3 (Phillips, Нидерланды) по стандартной методике при помощи линейного датчика частотой 5,0-10,0 МГц. Расчет степени стенозирования сонных артерий (СССА) определялся в зоне максимального сужения просвета артерии. Нами изучены скорость кровотока, характер, тип, эмбологенность, поверхность, длина и расположение атеросклеротической бляшки (АСБ). Показания к хирургическому лечению получены в соответствии с клиническими проявлениями и диагностическим протоколом.

Все пациенты осмотрены невропатологом, кардиологом, сосудистым хирургом. У всех больных с гемодинамически значимыми стенозами сонных артерий, поступившими в клинику Ташкентской медицинской академии (ТМА) после их письменного информированного согласия выполнена каротидная эндартерэктомия с использованием стандартных хирургических методов [1]. Образцы АСБ были получены сразу после каротидной эндартерэктомии и доставлены в лабораторию для определения цинка. У этих же отобранных больных за 1 день до операции однократно забирали кровь из локтевой вены утром натощак через 12 ч после приема пищи.

Все образцы венозной крови немедленно центрифугировались, сыворотки замораживались при температуре -20 градусов. В сыворотке крови определены липидный профиль: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), триглицериды (ТГ) с помощью набора реагентов Human (Германия) на биохимическом автоматическом анализаторе Mindray BS-200 (Китай). Вычислялись индекс (ИА) и коэффициент атерогенности (КА) по формуле:

$$\text{ИА} = \frac{\text{ХС ЛПНП}}{\text{ХС ЛПВП}} \text{ и } \text{КА} = \frac{\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}}{\text{ХС ЛПВП}}$$

Уровень цинка определен с помощью набора реагентов «Zinc-Vital» (Vital Development Corporation,

Россия) на биохимическом автоматическом анализаторе Mindray BS-200 (Китай). Количественное определение уровня цинка в волосах и в АСБ осуществлялось методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой (ОЭС-ИСП) на анализаторе Optima 2100 DV (Perkin Elmer, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили, вычисляя среднюю арифметическую величину (M) и стандартную ошибку (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами определяли с помощью t -критерия Стьюдента и считали статистически значимыми при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. У 90% больных с каротидным атеросклерозом выявлена артериальная гипертония, у 57% больных обнаружена гиперлипидемия. 23% больных имели ожирение, а 50% - сахарный диабет 2 типа. 93% больных поставлен диагноз ИБС, стенокардия напряжения. В анамнезе 13% больных перенесли инфаркт миокарда, а 60% больных инсульт (табл. 1)

При определении биохимических показателей в сыворотке крови среднее значение глюкозы, триглицеридов, индекса и коэффициента атерогенности было выше референсных пределов (табл. 2)

Результаты одновременного изучения концентрации цинка в волосах, биоптатах каротидных атеросклеротических бляшек и сыворотке крови у больных с каротидным атеросклерозом представлены на рис. 1, 2.

Как видно из рис. 2, самая высокая концентрация цинка находится в волосах ($208,41 \pm 16,21$ мкг/г), по сравнению с АСБ ($81,72 \pm 15,73$ мкг/г) и сыворотке крови ($10,42 \pm 0,41$ мкг/г), а уровень цинка выше в АСБ, чем в сыворотке крови. Заслуживает внимания тот, что развитые нестабильные атеросклеротические бляшки содержат более низкие уровни ионов цинка по сравнению с волосами. Эти данные не подтверждают гипотезу о том, что повышенные уровни ионов металлов могут быть основным причинным фактором, отягчающим течение атеросклероза [14, 21, 23].

При проведении корреляционного анализа данных выявлена положительная слабая взаимосвязь уровня цинка в сыворотке крови с его концентрацией в АСБ ($r = 0,29$; $p < 0,05$). Определение концентрации цинка в волосах обычно является хорошим способом для оценки обеспечения организма цинком. Наши результаты показывают, что с возрастом цинк в сыворотке крови и в АСБ снижается. Представляет интерес выявленная корреляционная связь между уровнем цинка в сыворотке и триглицеридами (табл. 3).

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире, и в 2016 г. от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) умерли 17,9 миллионов человек, что составляет 31% всех смертей в мире [25]. Прогнозируется, что к 2030 г. количество смертей от сердечно-сосудистых заболеваний достигнет 23,6 млн ежегодно. Три четверти этих смертей происходят в странах с низкими и средними доходами. Дефицит цинка наблюдается у

Таблица 1

Клинико-anamnestическая характеристика пациентов, включенных в исследование

Показатели	Значение (n=30)
Возраст, годы (M±m)	62,23±1,18
Мужчины, n (%)	27 (90)
Женщины, n (%)	3 (10)
Артериальная гипертония, n (%)	27 (90)
Гиперлипидемия, n (%)	17 (57)
Ожирение, n (%)	7 (23)
Сахарный диабет 2 типа, n (%)	15 (50)
Стенокардия напряжения, n (%):	
ФК II	25 (83)
ФК III	3 (10)
Инфаркт миокарда в анамнезе, n (%)	4 (13)
Перенесенный инсульт, n (%)	18 (60)
Индекс массы тела, кг/м ² (M±m)	26,86±0,74
СССА, % (M±m)	75,23±2,84

Примечание. n – абсолютное число больных, ФК – функциональный класс.

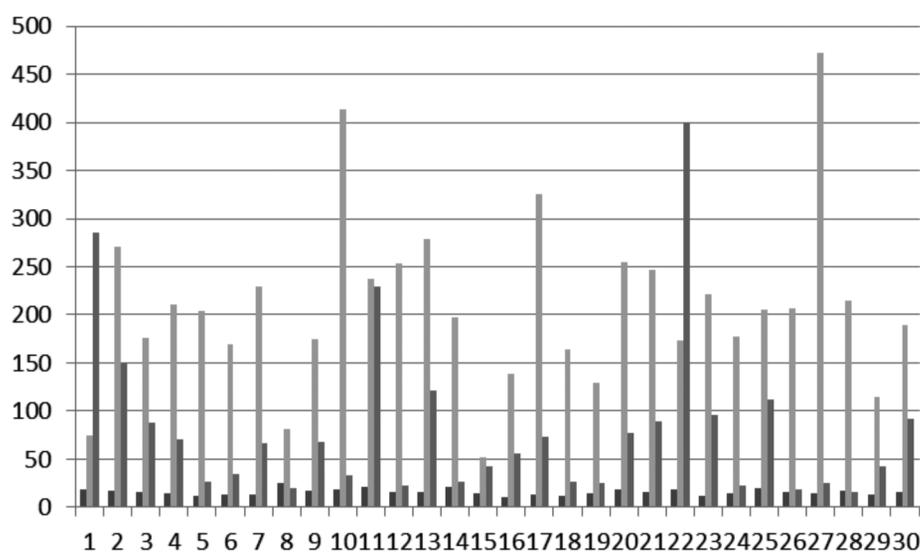


Рис. 1. Уровни цинка в волосах, АСБ и сыворотке крови всех пациентов.

По оси абсцисс – 1-й ряд – цинк в сыворотке (мкмоль/л), 2-й ряд – цинк в волосах (мкг/г), 3-й ряд – цинк в атеросклеротических бляшках (мкг/г), по оси ординат – концентрация цинка (мкг/г).

17% населения мира, до 35% у населения с низкими доходами, то есть в Южной Азии и Африке [16].

Цинк (Zn) является одним из важнейших микроэлементов, участвующих в многочисленных биологических функциях, например, дифференцировке и пролиферации клеток, клеточном транспорте, синтезе ДНК, функционировании эндокринной, иммунной и центральной нервной системы, воспроизводстве, экспрессии генов и гомеостазе. Обладая способностью связывать более 300 ферментов и более 2000 факторов транскрипции, он часто рассматривается как многоцелевой микроэлемент [6].

Связь между потреблением Zn и статусом Zn с патогенезом ССЗ продемонстрирована несколькими экспериментальными и клиническими исследовани-

ями. Дисбаланс гомеостаза Zn в значительной степени способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний, таких, как ИБС, застойная сердечная недостаточность (СН), ишемическая кардиомиопатия, инфаркт миокарда, внезапная сердечная смерть и смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Антиоксидантная и прооксидантная функции Zn могут иметь различные положительные эффекты в снижении сердечно-сосудистых заболеваний и могут предотвращать развитие ССЗ [11, 7].

Адекватные уровни цинка являются критическим компонентом передачи сигналов рецептора, активируемого пролифератором пероксисом при атеросклерозе [22]. Кроме того, у пациентов с ИБС наблюдается низкий уровень цинка, что полностью соответствует

Таблица 2

Характеристика биохимических показателей липидного профиля и концентрации глюкозы в сыворотке больных

Показатели	Значение (M±m)
Глюкоза, ммоль/л	6,59±0,44
ОХС, ммоль/л	4,65±0,18
ТГ, ммоль/л	2,37±0,28
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,04±0,05
ХС ЛПНП, ммоль/л	3,32±0,15
Индекс атерогенности (ИА)	3,32±0,17
Коэффициент атерогенности (КА)	3,60±0,17

Таблица 3

Корреляционные связи концентрации цинка в различных биологических субстратах пациентов

Показатели	Zn в крови (мкмоль/л)	Zn в волосах (мкг/г)	Zn в АСБ (мкг/г)
Глюкоза, ммоль/л	r=-0,04	r=0,12	r=-0,24
ОХС, ммоль/л	r=-0,03	r=-0,08	r=0,24
ТГ, ммоль/л	r=0,39*	r=-0,11	r=-0,03
ХС ЛПВП, ммоль/л	r=-0,19	r=-0,09	r=0,10
ХС ЛПНП, ммоль/л	r=0,15	r=0,05	r=0,29
ИА	r=0,26	r=0,03	r=0,14
КА	r=0,17	r=-0,05	r=0,12
Возраст, годы	r=-0,40*	r=-0,06	r=-0,45*

Примечание. *- p<0,05.

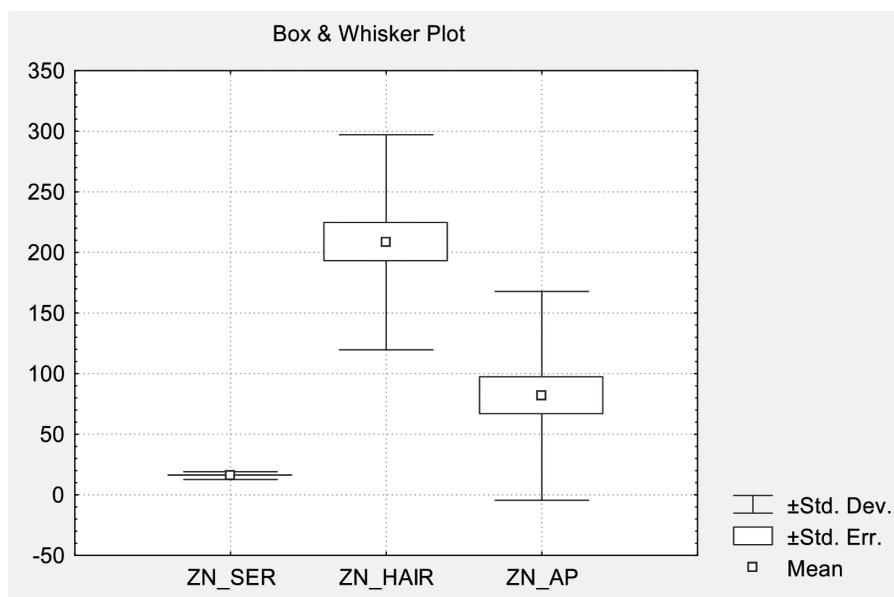


Рис. 2. Среднее содержание цинка в различных биосубстратах (волосах, биоптатах АСБ и сыворотке крови) у больных с каротидным атеросклерозом.

полученным нами данным [10]. Дефицит цинка способствует утолщению сосудистой стенки из-за повышенной пролиферации и гипертрофии [3].

Низкие уровни цинка в сыворотке крови выявляются у людей с сердечной недостаточностью [8, 26]. Zn также играет роль в окислительно-восстанови-

тельных сигнальных путях и улучшает антиапоптотическую, противовоспалительную и антиоксидантную активность [17, 18].

Дефицит Zn может приводить к деградации важных белков, таких, как протеин-креатинкиназа, стимулировать выработку воспалительных цитокинов и

C-реактивных белков и может задерживать составляющие в моноцитах и макрофагах [5].

Уровни Zn в сыворотке крови значительно снижаются у пациентов с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ), и наблюдается значительная обратная связь между статусом Zn и ГЛЖ [12]. У пациентов с ишемическим инсультом уровень цинка в сыворотке крови ниже, чем у здоровых людей [19].

Точно также более низкие уровни Zn в сыворотке крови наблюдаются у пациентов с сердечной недостаточностью и у пациентов с диастолической функцией левого желудочка [4]. Кроме того, уровни цинка в сыворотке крови обратно пропорциональны снижению гомеостаза глюкозы и инсулинорезистентности [9].

Низкая концентрация Zn в сыворотке крови предсказывает смертность у пациентов, нуждающихся в коронарной ангиографии [20]. Более того, уровни цинка в сыворотке крови могут быть достоверным диагностическим индикатором острого инфаркта миокарда (ИМ) [15]. Согласно данным метаанализа, повышенная распространенность ИБС связана с более низким потреблением цинка с пищей, с прямой связью между статусом цинка и ИМ.

Механизмы действия белков-переносчиков Zn требуют дополнительных исследований. Для улучшения наших знаний о патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний требуется подробный и тщательный анализ деятельности этих переносчиков.

Можно сформулировать несколько важных направлений для изучения биологической роли цинка. Так, требуются дополнительные исследования, чтобы объяснить взаимосвязь между конкретными генетическими профилями и статусом цинка. Дальнейшие исследования должны прояснить взаимодействие генов с питательными веществами и их связь со статусом Zn и ССЗ. Было бы полезно разработать подходящие методы для измерения эндотелиального Zn как биомаркера сосудистой недостаточности Zn. Взаимодействие между уровнями Zn и NO также требует дальнейшего изучения. Экспрессия и функции/дисфункции транспортеров Zn в тканях сосудов и генетические факторы риска, связанные с транспортерами Zn, должны быть дополнительно исследованы.

Гомеостаз цинка нарушается на ранних стадиях ССЗ, поэтому вмешательство с помощью терапии, связанной с цинком, может дать значительные преимущества. Роль добавок Zn при ССЗ должна быть более интенсивно исследована, чтобы найти безопасные и желательные уровни добавок Zn и, кроме того, определить дозу и продолжительность, которые были бы наиболее полезными, в первую очередь, для предотвращения и, если необходимо, для лечения различных патологий, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Считаем, что проведенное исследование дает четкое представление о концентрации цинка в различных биосубстратах больных с нестабильными атеросклеротическими бляшками и углубляет наши знания в области патогенеза атеросклероза и понимания той роли, которую играет в нем данный микроэлемент.

Выводы

1. Снижение концентрации цинка в сыворотке крови сопровождается снижением уровня цинка в атеросклеротических бляшках.

2. С возрастом уровень цинка в сыворотке крови и в биоптатах атеросклеротических бляшек снижается.

3. Изучение концентрации цинка в различных биосубстратах больных с нестабильными атеросклеротическими бляшками открывает новые грани в понимании роли цинка в патогенезе атеросклероза.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3–26 с.м. REFERENCES)

1. Каримов Ш.И., Суннатов Р.Д., Ирнazarов А.А., Юлбарисов А.А., Муминов Р.Т., Алиджанов Х.К. Хирургические аспекты лечения двухстороннего атеросклеротического поражения сонных артерий. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2014; 2: 118-23.
2. Скальная М.Г. Обоснование коррекции элементного дисбаланса у женщин перименопаузального возраста, страдающих обменными заболеваниями. *Эстетическая медицина*. 2010; 2: 164-9.

REFERENCES

1. Karimov Sh.I., Sunnatov R.D., Irnazarov A.A., Yulbarisov A.A., Muminov R.T., Alidzhanov Kh.K. Surgical aspects of the treatment of bilateral atherosclerotic lesions of the carotid arteries. *Angiologiya I sosudistaya khirurgiya*. 2014; 2: 118-23. (in Russian)
2. Skal'naya M.G. Substantiation of correction of elemental imbalance in women of perimenopausal age suffering from metabolic diseases. *Esteticheskaya meditsina*. 2010; 2: 164-9. (in Russian)
3. Alcantara E.H., Shin M.Y., Feldmann J., Nixon G.F., Beattie J.H., Kwun I.S. Long-term zinc deprivation accelerates rat vascular smooth muscle cell proliferation involving the down-regulation of JNK1/2 expression in MAPK signaling. *Atherosclerosis*. 2013; 228:46–52.
4. Alexanian I., Parissis J., Farmakis D., Athanasis S., Pappas L., Gavrielatos G. et al. Clinical and echocardiographic correlates of serum copper and zinc in acute and chronic heart failure. *Clin. Res. Cardiol*. 2014; 103:938–49.
5. Bao B., Prasad A.S., Beck F.W., Fitzgerald J.T., Snell D., Bao G.W. et al. Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. *Am. J. Clin. Nutr*. 2010; 91:1634–41.
6. Chasapis C.T., Loutsidou A.C., Spiliopoulou C.A., Stefanidou M.E. Zinc and human health: an update. *Arch. Toxicol*. 2012; 86:521–34. DOI: 10.1007/s00204-011-0775-1.
7. Choi S., Liu X., Pan Z. Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin*. 2018; 39:1120–32.
8. Cohen N., Golik A. Zinc balance and medications commonly used in the management of heart failure. *Heart Fail Rev*. 2006; 11:19–24.
9. Giannoglou G.D., Konstantinou D.M., Kovatsi L., Chatzizisis Y.S., Mikhailidis D.P. Association of reduced zinc status with angiographically severe coronary atherosclerosis: a pilot study. *Angiology*. 2010; 61:449–55.
10. Hashemian M., Poustchi H., Mohammadi-Nasrabadi F., Hekmatdoust A. Systematic review of zinc biochemical indicators and risk of coronary heart disease. *ARYA Arther*. 2015; 11:357–65.
11. Huang L., Teng T., Bian B., Yao W., Yu X., Wang Z. et al. Zinc levels in left ventricular hypertrophy. *Biol. Trace Elem. Res*. 2017; 176:48–55.
12. Huang L., Teng T., Bian B., Yao W., Yu X., Wang Z., et al. Zinc levels in left ventricular hypertrophy. *Biol. Trace Elem. Res*. 2017; 176:48–55.
13. Jayawardena R., Ranasinghe P., Galappaththy P., Malkanthi Rldk., Constantine Gr., Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2012; 4: 13.

BIOCHEMISTRY

14. Kazi T.G., Afridi H.I., Kazi N., Jamali M.K., Arain M.B., Jalbani N. et al. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2008; 122: 1-18.
15. Liu B., Cai Z-Q., Zhou Y-M. Deficient zinc levels and myocardial infarction. *Biol. Trace Elem. Res.* 2015; 165:41–50.
16. Maxfield L., Crane J.S. Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/NBK493231/> (accessed March 20, 2021).
17. Mohammadifard N., Humphries K.H., Gotay C., Mena-Sanchez G., Salas-Salvado J., Esmailzadeh A. et al. Trace minerals intake: risks and benefits for cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59:1334–46.
18. Mohammadifard N., Humphries K.H., Gotay C., Mena-Sanchez G., Salas-Salvado J., Esmailzadeh A., et al. Trace minerals intake: risks and benefits for cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019; 59:1334–46.
19. Munshi A., Babu S., Kaul S., Shafi G., Rajeshwar K., Alladi S. et al. Depletion of serum zinc in ischemic stroke patients. *Methods and Findings in Exp. and Clin. Pharm.* 2010; 32:433.
20. Pilz S., Dobnig H., Winklhofer-Roob B.M., Renner W., Seelhorst U., Wellnitz B. et al. Low serum zinc concentrations predict mortality in patients referred to coronary angiography. *Br. J. Nutr.* 2009; 101:1534–40.
21. Radak D., Cvetković Z., Tasić N. et al. The content of copper and zinc in human ulcerated carotid plaque. *Srp. Arh. Celok Lek.* 2004; 132: 80–4.
22. Reiterer G., MacDonald R., Browning J.D., Morrow J., Matveev S.V., Daugherty A. et al. Zinc deficiency increases plasma lipids and atherosclerotic markers in LDL-receptor-deficient mice. *J. Nutr.* 2005; 135:2114–8.
23. Su Kyoung Jung, Mi-Kyung Kim, Young-Hoon Lee, Dong Hoon Shin, Min-Ho Shin, Byung-Yeol Chun et al. Lower Zinc Bioavailability May Be Related to Higher Risk of Subclinical Atherosclerosis in Korean Adults. *Plos One.* 2013; 6: 8(11):e80115.
24. Tamura Y. The Role of Zinc Homeostasis in the Prevention of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* 2021 Jun 19. DOI: 10.5551/jat.RV17057.
25. WHO. Available Online at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (accessed February 18, 2021).
26. Yu X., Huang L., Zhao J., Wang Z., Yao W., Wu X., et al. The relationship between serum zinc level and heart failure: a meta-analysis. *Biol. Med. Res. Int.* 2018; 2018:2739014.

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Мурашко Д.И.¹, Таганович А.Д.¹, Ковганко Н.Н.¹, Готько О.В.², Прохорова В.И.²

К ВОПРОСУ О ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТОК КРОВИ И ИХ ЛИГАНДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

¹УО Белорусский государственный медицинский университет Минздрава Республики Беларусь, 220116, г. Минск, Беларусь;

²ГУ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова Минздрава Республики Беларусь, 223040, Минская область, Беларусь

Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) занимает первое место в структуре смертности вследствие онкологических заболеваний. Поздняя диагностика ухудшает эффективность его лечения. Не существует информативных биомаркеров, позволяющих судить о распространенности опухолевого процесса, особенно на ранних стадиях НМКРЛ. Цель – определить уровень CXCL5, CXCL8, CXCR1 и CXCR2 в периферической крови пациентов с НМКРЛ для оценки возможности их использования в диагностике заболевания. Материалом служила кровь 218 пациентов с НМКРЛ, 19 пациентов с гамартомой легкого и 42 здоровых людей. Концентрацию CXCL5, CXCL8, SCC в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа, уровень CYFRA 21-1 – методом иммунохемилюминесцентного анализа. Долю лейкоцитов, снабженных рецепторами CXCR1 и CXCR2, и интенсивность флуоресценции в них комплексов рецепторов с антителами (MFI), измеряли методом проточной цитометрии. MFI CXCR1 в гранулоцитах и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, возрастали в крови уже при I стадии НМКРЛ и демонстрировали еще более существенный рост на последующих стадиях. Уровень этих показателей был коррелятивно связан со стадиями и характеристиками НМКРЛ. Измерение уровня MFI CXCR1 в сыворотке крови позволяет диагностировать ранние стадии НМКРЛ с чувствительностью 87,4% (специфичность – 73,8%). Определение доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, демонстрирует сопоставимую диагностическую чувствительность (87,2%) и специфичность 66,7% при выявлении I-II стадий НМКРЛ. MFI CXCR1 в гранулоцитах также может использоваться для дифференцирования I и II стадий НМКРЛ (диагностическая чувствительность – 75,3%, специфичность – 69,6%). Чувствительность определения с этой целью доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, составляет 75,0% при специфичности 71,7%. У 89,7% пациентов с III-IV стадиями НМКРЛ MFI CXCR1 в гранулоцитах превышает пороговое значение 47,8 (специфичность – 74,8%). Диагностическая чувствительность определения с этой целью доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, составила 90,7%.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого; кровь; CXCL5; CXCL8; CXCR1; CXCR2.

Для цитирования: Мурашко Д.И., Таганович А.Д., Ковганко Н.Н., Готько О.В., Прохорова В.И. К вопросу о диагностической ценности определения уровня рецепторов клеток крови и их лигандов в сыворотке крови при немелкоклеточном раке легкого. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 277-285. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-277-285>

Для корреспонденции: Мурашко Дарья Игоревна, ассистент каф. биологической химии; e-mail: dashamurashka@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.03.2022

Принята к печати 30.03.2022

Опубликовано 21.05.2022

Murashka D.I.¹, Tahanovich A.D.¹, Kauhanka M.M.¹, Prokhorova V.I.², Gotko O.V.²

ON THE ISSUE OF DIAGNOSTIC VALUE OF DETERMINING THE LEVEL OF RECEPTORS AND THEIR LIGANDS IN BLOOD IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

¹Belarusian stage medical university, Belarusian Ministry of Health, 220116, Minsk, Belarus;

²N. N. Alexandrov Republican Scientific- Practical Centre of Oncology and Medical Radiology, Belarusian Ministry of Health, 223040, Lyasnoy, Minsk region, Belarus

Non-small cell lung cancer (NSCLC) occupies the first place in the structure of mortality due to oncological diseases. Late diagnosis worsens the effectiveness of its treatment. There are no informative biomarkers that allow us to judge the prevalence of the tumor process, especially in the early stages of NSCLC. To determine the level of CXCL5, CXCL8, CXCR1 and CXCR2 in the peripheral blood of patients with NSCLC to assess the possibility of their use in the diagnosis of the disease. The material was the blood of 218 patients with NSCLC, 19 patients with lung hamartoma and 42 healthy people. The concentration of CXCL5, CXCL8, and SCC in blood serum was determined by enzyme immunoassay, the CYFRA 21-1 level was determined by immunochemiluminescence analysis. The proportion of leukocytes equipped with CXCR1 and CXCR2 receptors and the fluorescence intensity of receptor complexes with antibodies (MFI) in them were measured by flow cytometry. MFI CXCR1 in granulocytes and the proportion of lymphocytes supplied CXCR2, increased in the blood already at stage I of NSCLC and showed an even more significant increase in subsequent stages. The level of these indicators was correlatively related to the stages and characteristics of NSCLC. Measuring the level of MFI CXCR1 in the blood serum makes it possible to diagnose the early stages of NSCLC with a sensitivity of 87.4%

(specificity – 73.8%). Determination of the proportion of lymphocytes equipped with CXCR2 demonstrates comparable diagnostic sensitivity (87.2%) and specificity of 66.7% in the detection of stages I-II of NSCLC. MFI CXCR1 in granulocytes can also be used to differentiate stages I and II of NSCLC (diagnostic sensitivity – 75.3%, specificity – 69.6%). The sensitivity of determining for this purpose the proportion of lymphocytes equipped with CXCR2 is 75.0% with a specificity of 71.7%. In 89.7% of patients with stages III-IV NSCLC, the MFI CXCR1 in granulocytes exceeds the threshold value of 47.8 (specificity – 74.8%). Diagnostic sensitivity of determining the proportion of lymphocytes for this purpose was 90.7%.

Key words: non-small cell lung cancer; blood; CXCL5; CXCL8; CXCR1; CXCR2.

For citation: Murashka D.I., Tahanovich A.D., Kauhanka M.M., Prokhorova V.I., Gotko O.V. On the issue of diagnostic value of determining the level of receptors and their ligands in blood in non-small cell lung cancer. *Klinicheskaya laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 277-285 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-277-285>

For correspondence: Murashka D.I., assistant of the department of biological chemistry; e-mail: dashamurashka@mail.ru

Information about authors:

Murashka D.I., <https://orcid.org/0000-0002-1890-6252>;
Tahanovich A.D., <https://orcid.org/0000-0002-0668-2888>;
Kauhanka M.M., <https://orcid.org/0000-0002-3193-5955>;
Prokhorova V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6078-4447>;
Gotko O.V., <https://orcid.org/0000-0001-8083-0861>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.03.2022

Accepted 30.03.2022

Published 21.05.2022

Введение. Рак легкого – одно из наиболее распространенных в мире злокачественных новообразований, на долю которого ежегодно приходится не менее 18% смертности вследствие онкологических заболеваний [1]. Гистологически рак легкого подразделяется на мелкоклеточную (15%) и немелкоклеточную (85%) формы. Немелкоклеточный рак (НМКРЛ) характеризуется менее агрессивным, но зачастую бессимптомным течением. По этой причине ранняя диагностика этого заболевания чрезвычайно затруднена. Лишь 25% случаев НМКРЛ диагностируется на ранних (I-II) его стадиях [2].

Поздняя диагностика существенно ухудшает прогноз течения и эффективность лечения НМКРЛ. Если при I стадии заболевания пятилетняя выживаемость пациентов составляет 73%, то уже при II стадии она снижается более чем в два раза. На IV стадии НМКРЛ выживаемость пациентов более, чем в пять раз ниже, чем при I стадии (13%) [3, 4]. Столь существенные различия обусловлены характеристиками опухоли: ее размером, наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и внутренние органы. Немаловажное значение имеет степень дифференцировки клеток опухоли (Grade), которая отражает степень ее агрессивности [4].

Используемые в настоящее время способы диагностики НМКРЛ не всегда позволяют выявить опухолевый процесс на ранних стадиях заболевания. В связи с этим, наряду с применением общепринятых методов диагностики (компьютерная томография и гистологическое исследование биопсийного материала) активно ведется поиск биомаркеров этого заболевания, в том числе, в крови пациентов. Это в частности, изучаются перспективные определения в сыворотке крови уровня опухолеассоциированных антигенов (CYFRA 21-1, SCC, NSE, CEA и пр.) [5]. Однако данные литературы относительно диагностической эффективности определения их концентрации в крови при НМКРЛ противоречивы. Показатели диагностической чувствительности измерения уровня фрагмента цитокератина 19 (CYFRA 21-1) в сыворотке крови пациентов с этим заболеванием варьируют от 40% до 72% [5–7].

Одной из важнейших составляющих онкогенеза является опухолеассоциированное воспаление. Цитокины и хемокины, будучи неперенными участниками воспалительной реакции, интенсивно экспрессируются клетками растущей опухоли и принимают участие в пролиферации, ангиогенезе и метастазировании.

Основной функцией провоспалительного хемокина CXCL5 является хемотаксис нейтрофилов, в том числе, в зоне онкогенеза. Вместе с тем, взаимодействуя с хемокиновым рецептором CXCR2, он запускает сигнальные пути, приводящие к активации внутриклеточных протеинкиназ и усилению пролиферации опухолевых клеток [8, 9].

Еще один провоспалительный хемокин CXCL8 обладает ангиогенной активностью. Подобно CXCL5, он способен связываться с мембранным рецептором CXCR2. Наряду с этим, он также обладает сродством к более специфичному рецептору – CXCR1. Конечными эффектами оси CXCL8/CXCR1/2 является активация транскрипции гена сосудистого фактора роста (VEGF), усиление пролиферации эндотелиоцитов и опухолевых клеток и поддержание воспалительной реакции в зоне онкогенеза [10].

Данные различных исследователей свидетельствуют о взаимосвязи уровня хемокинов CXCL5 и CXCL8 и их рецепторов CXCR1 и CXCR2 в опухолевой ткани с характеристиками опухоли, стадиями и прогнозом течения различных злокачественных новообразований, в том числе, НМКРЛ [11–17]. Ранее нами был отмечен существенный рост уровня этих соединений и в периферической крови пациентов с этим заболеванием, ассоциация их со стадиями опухолевого процесса, размером и метастазированием опухоли. Однако в этих исследованиях в силу ограниченного количества пациентов не проводилось анализа концентрации CXCL5, CXCL8, CXCR1 и CXCR2 в крови пациентов отдельно, с I и со II стадиями НМКРЛ [18]. В связи с этим, целью настоящего исследования явилась оценка возможности использования компонентов сигнальных систем CXCL8/CXCR1/2, CXCL5/CXCR2 в периферической крови пациентов с НМКРЛ для ранней диагностики этого заболевания.

Материал и методы. Для проведения исследования типа «случай-контроль» обследованы 218 пациентов с НМКРЛ (65 женщин и 153 мужчины) при поступлении в стационар РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова в период 2019-2021 гг. У 52 из них была диагностирована I стадия заболевания, 73 имели II стадию, 93 – III-IV стадии. У 160 пациентов размер первичной опухоли не превышал 5 см (T1-2), 58 имели опухоль размером более 5 см (T3-4). 86 пациентов имели метастазы НМКРЛ в регионарные лимфатические узлы, у 24 обнаружены отдаленные метастазы (M1). Высокодифференцированная опухоль (Grade 1) наблюдалась у 53, средненидифференцированная (Grade 2) – у 90 и низкодифференцированная (Grade 3) – у 39 пациентов. Критериями исключения из исследования являлись сопутствующие заболевания органов дыхания, онкологические заболевания в анамнезе, метастатические поражения легких. В качестве группы контроля обследованы 42 человека без проявлений заболевания в возрасте 43 – 67 лет. Дополнительная группа сравнения включала 19 пациентов с гамартомой – доброкачественной опухолью легкого.

Кровь из локтевой вены пациентов и здоровых людей забирали натощак в вакутайнер с ЭДТА-К2 (Improvacuter, КНР). Для получения сыворотки кровь вносили в пробирку с тромбином и разделительным гелем (Improvacuter, КНР).

Определение концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛИА) с помощью наборов реагентов на ИХЛИА-анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics, США).

Для измерения уровня CXCL5, CXCL8 и SCC в сыворотке крови пациентов и здоровых людей использовали ИФА-наборы Fine Test (КНР), автоматический ИФА-анализатор Brio (Seac, Италия) и планшетный фотометр Sirio (Seac, Италия). Измерение оптической плотности стандартных разведений и образцов проводили при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм.

Относительное количество клеток крови, снабженных рецепторами CXCR1 и CXCR2, и интенсивность флуоресценции комплексов антитело-рецептор (MFI), пропорциональную плотности расположения рецепторов в клетках, определяли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-К2, и 10 мкл соответствующих антител, содержащих флуоресцентные метки: CXCR1 – PE/Cy5 (BioLegend, США), CXCR2-PE (BioLegend, США), CD45 – Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

Анализ популяций лейкоцитов проводили с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, США). Общая популяция лейкоцитов определялась в соответствии с наличием у клеток цельной крови панлейкоцитарного рецептора CD45. На основании показателей интенсивности малоуглового (FS, Forward Scatter) и бокового (SS, Side Scatter) светорассеяния из общей массы клеток лейкоцитарного ряда выделялись популяции лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов. В каждой из популяций лейкоцитов определяли

долю клеток, содержащих рецепторы CXCR1 и CXCR2 и интенсивность флуоресценции комплекса антитело/рецептор, пропорциональную плотности расположения рецепторов в клеточных мембранах. Для этого осуществляли анализ графиков зависимости интенсивности бокового рассеяния клеток соответствующей популяции от интенсивности флуоресценции в каналах с флуоресцентными метками (рис. 1).

Поскольку значения показателей не подчинялись нормальному распределению на основании критерия Колмогорова-Смирнова, анализ проводили методами непараметрической статистики с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics 23 (IBM, США). Рассчитывались медиана и интерквартильный размах (25% – 75%). Для оценки различий уровня определяемых показателей в нескольких независимых группах применяли Н-критерий Краскелла-Уоллиса. Критическое значение уровня значимости критерия принимали равным 5% ($p < 0,05$). При наличии статистически значимых различий осуществляли сравнения уровня показателей в анализируемых группах с применением U-критерия Манна-Уитни. В соответствии с поправкой Бонферрони на множественные сравнения, критический уровень его значимости рассчитывали по общепринятой формуле [19].

О характере и силе взаимосвязи между уровнем показателей и степенью распространенности опухолевого процесса судили на основании расчета коэффициента корреляции Спирмена (R). Оценку диагностической информативности показателей биохимических тестов проводили с помощью характеристических кривых (ROC-анализ). В последующем вычисляли площадь под ROC-кривой (AUC, англ. Area Under Curve), на основании которой оценивали надежность определяемого показателя как потенциального биомаркера.

О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС) и диагностической эффективности теста (ДЭ). Пороговое значение диагностического теста определяли как величину оптимального сочетания показателей диагностической чувствительности и диагностической специфичности теста при построении ROC-кривых.

Результаты. Уровень CXCL8 в крови пациентов с I стадией НМКРЛ не отличается от такового у здоровых людей. На II, III и IV стадиях заболевания он существенно возрастает по сравнению с группой здоровых людей и пациентами с гамартомой легкого. Вместе с тем, концентрация в крови CXCL5 у пациентов с ранними и поздними стадиями НМКРЛ не отличается от таковой в контрольных группах.

Доля гранулоцитов, снабженных рецептором CXCR1, не демонстрирует существенных различий у здоровых людей, пациентов с гамартомой и пациентов с I стадией НМКРЛ. Однако у пациентов со II, III и IV стадиями НМКРЛ она значительно выше, чем в группе контроля. Наряду с этим, относительное количество гранулоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов с НМКРЛ не отличается от значений этого показателя в контрольных группах.

Плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах пациентов в 1,5 раза выше, чем у здоровых людей и пациентов с гамартомой, уже на I стадии заболевания и демонстрирует дальнейший существенный рост на последующих стадиях. Максимальный уровень MFI CXCR1

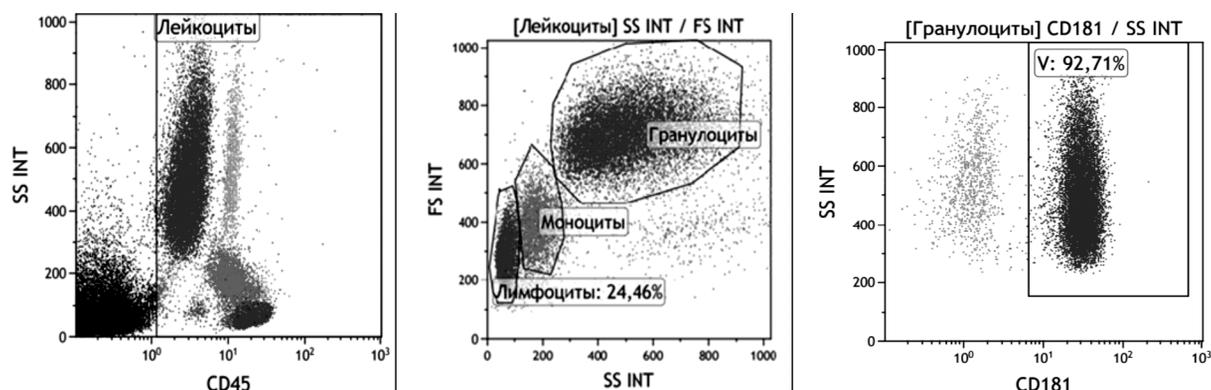


Рис. 1. Демонстрация определения гранулоцитов, содержащих рецептор CXCR1, с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis 2.1.

в гранулоцитах (в 3 раза выше, чем в группе контроля) отмечается у пациентов с III-IV стадиями НМКРЛ. Значительно менее существенным изменениям подвергается MFI CXCR2 в гранулоцитах. Уровень этого показателя не отличается в крови здоровых людей и пациентов с ранними и поздними стадиями НМКРЛ. Значительных различий доли моноцитов, содержащих CXCR1 и CXCR2, в крови пациентов с НМКРЛ и здоровых людей также нет.

Относительное количество лимфоцитов, снабженных CXCR1, у пациентов с I стадией заболевания существенно отличается от здоровых людей, но не пациентов с гамартомой, однако при II стадии НМКРЛ уровень этого показателя превышает таковой в обеих контрольных группах. Еще более значительно (в два раза по сравнению с пациентами со II стадией НМКРЛ) он возрастает при III-IV стадиях заболевания.

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, значительно увеличивается по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с гамартомой уже при I стадии НМКРЛ. У пациентов со II стадией заболевания она в 1,5 раза выше, чем при I. На III-IV стадиях уровень этого параметра максимален (в 3,4 раза выше по сравнению со здоровыми людьми). MFI CXCR1 и CXCR2 как в лимфоцитах, так и в моноцитах пациентов с НМКРЛ значительно выше, чем у здоровых людей, и не изменяются в зависимости от стадии заболевания.

Уровень CYFRA 21-1 в крови пациентов с I и II стадией заболевания был практически в три раза выше, чем у здоровых людей, и еще более существенно возрастал при III-IV стадиях НМКРЛ. Концентрация другого «классического» опухолеассоциированного антигена SCC не изменяется у пациентов с I стадией заболевания по сравнению со здоровыми людьми, однако значительно возрастает у пациентов с II стадией НМКРЛ. На III-IV стадиях заболевания его уровень в крови пациентов снижается (табл. 1).

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о наличии связи доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах и уровня CYFRA 21-1 в сыворотке крови со стадиями НМКРЛ ($R = 0,652$ ($p < 0,001$, 95% ДИ 0,636 – 0,750), $0,572$ ($p < 0,001$, 95% ДИ 0,553 – 0,719) и $0,453$ ($p < 0,001$, 95% ДИ 0,419 – 0,653), соответственно).

MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов с размером опухоли менее 3 см (T1) существенно превышает таковой в группе здоровых людей (табл. 2). У пациентов

с опухолью размером 3-5 см (T2) уровень этого показателя на 33,6% выше по сравнению с пациентами T1. Максимальный уровень этого показателя отмечается в крови пациентов с T4. Он более, чем в 4 раза превышает таковой в группе контроля.

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, в 1,6 раза увеличена у пациентов с T2 по сравнению с T1. В крови пациентов с T3-4 относительное количество лимфоцитов, снабженных CXCR2, демонстрирует дальнейший существенный рост и практически вдвое превышает таковое у пациентов с T1.

Уровень CYFRA 21-1 в крови пациентов с T1 практически втрое выше, чем у здоровых людей. В крови пациентов с размером опухоли 3-7 см (T2-3) он существенно больше, чем в группе T1. Наряду с этим, у пациентов с T4 концентрация этого показателя снижается.

Доля лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR2, и концентрация CYFRA 21-1 в крови пациентов, не имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы (N0), существенно выше, чем здоровых людей. Ни один из упомянутых показателей существенно не отличается у пациентов N1 по сравнению с N0. Наряду с этим, отмечается существенный рост уровня этих показателей у пациентов N2 по сравнению с группой N1. Уровень CYFRA 21-1 в крови пациентов N3 демонстрирует дальнейший рост и в 1,7 раза превышает таковой пациентов, не имеющих метастазы в регионарные лимфоузлы, в то время как относительное количество лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов N3 не отличается от такового при N0-N2.

Уровень CXCL8 в крови пациентов без отдаленных метастазов (M0) вдвое превышает таковой в контрольной группе. Отмечается существенный рост его концентрации в крови пациентов, имеющих метастазы (M1): он вдвое выше, чем у пациентов M0. Сходные изменения демонстрирует уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови. Менее значительным изменениям подвергается MFI CXCR1 в гранулоцитах и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2. Уровень этих показателей в крови пациентов с отдаленными метастазами увеличивается в 1,2 раза по сравнению с не имеющими таковых.

Доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов с высокодифференцированной опухолью (G1) не демонстрирует существенных отличий от таковой при среднедифференцированном НМКРЛ (G2). В то же время, у пациентов с низкодифференцированной опухолью (G3)

Таблица 1

Уровень CXCL5, CXCL8, CXCR1 и CXCR2 в крови пациентов с НМКРЛ

Показатель	Контроль	Гамартома	Стадия I	Стадия II	Стадия III-IV
CXCL8, пг/мл	88,8 [47,7;168,2]	90,5 [54,8;98,9]	139,0 [75,6;260,2]	188,2 ^{1,2} [91,2;320,8]	216,0 ^{1,2} [136,2;414,4]
CXCR1, гранулоциты, %	93,9 [91,9;94,6]	94,0 [91,1;95,8]	95,6 [91,6;96,5]	95,2 ^{1,2} [94,6;96,1]	96,2 ^{1,2} [93,9;97,6]
CXCR1, гранулоциты, MFI	20,1 [9,9;27,6]	19,9 [17,6;22,1]	32,1 ^{1,2} [22,3;47,2]	47,2 ^{1,2,3} [36,5;51,7]	57,9 ^{1,2,3,4} [54,3;66,8]
CXCR1, лимфоциты, %	4,6 [2,2;8,3]	6,5 [3,3;10,0]	12,6 ¹ [5,7;19,7]	12,1 ^{1,2} [8,4;15,4]	15,0 ^{1,2} [7,1;20,0]
CXCR1, лимфоциты, MFI	1,8 [1,6;2,2]	3,2 [1,9;3,2]	3,5 ¹ [2,8;13,7]	3,5 ^{1,2} [2,8;12,9]	3,5 ^{1,2} [2,5;6,4]
CXCR1, моноциты, %	91,9 [89,5;95,5]	92,9 [78,0;93,8]	92,1 [87,0;93,2]	93,3 [80,8;95,8]	93,1 [49,9;96,5]
CXCR1, моноциты, MFI	2,2 [1,9;2,6]	2,5 [2,1;3,6]	2,7 ¹ [2,5;4,4]	2,8 ¹ [2,3;3,5]	3,9 ¹ [2,5;9,5]
CXCL5, нг/мл	1,1 [0,5;1,9]	1,2 [0,9;1,4]	1,3 [0,9;1,7]	1,6 [1,0;3,0]	1,5 [0,8;2,1]
CXCR2, гранулоциты, %	93,0 [90,3;95,3]	94,3 [91,3; 96,7]	94,5 [91,2;95,7]	94,8 [93,1;96,7]	95,9 [89,4;96,7]
CXCR2, гранулоциты, MFI	93,1 [79,3;97,1]	97,2 [69,7;100,2]	97,4 [86,8;120,2]	99,3 [73,9;145,9]	98,1 [80,4;116,9]
CXCR2, лимфоциты, %	9,5 [6,6;12,6]	11,4 [10,2; 12,9]	16,6 ^{1,2} [12,2;18,7]	25,1 ^{1,2,3} [17,7;28,3]	32,1 ^{1,2,3,4} [27,8;34,3]
CXCR2, лимфоциты, MFI	12,2 [7,2;17,2]	13,1 [10,4; 16,5]	16,4 [12,0;19,6]	18,1 ^{1,2} [12,9;19,4]	18,9 ^{1,2} [13,1;19,4]
CXCR2, моноциты, %	94,2 [93,4;95,7]	95,5 [93,1; 97,2]	95,5 [87,7;97,8]	95,4 [91,2;97,8]	95,6 [94,4;97,9]
CXCR2, моноциты, MFI	13,4 [12,3;17,1]	21,5 ¹ [19,9; 23,6]	23,4 ¹ [21,3;32,3]	24,7 ^{1,2} [22,5;39,3]	26,9 ^{1,2} [21,5;32,1]
CYFRA 21-1, нг/мл	1,1 [1,2;2,0]	1,3 [1,2;2,9]	2,7 ^{1,2} [1,9;3,7]	3,1 ^{1,2} [2,2;5,0]	4,9 ^{1,2,3,4} [3,3;7,4]
SCC, пг/мл	1,5 [1,2;1,9]	1,9 [1,2;2,9]	1,7 [2,2;2,7]	2,1 ^{1,3} [1,5;3,2]	1,8 ¹ [1,4;3,1]

Примечание. ¹ – достоверность разницы у пациентов с различными стадиями НМКРЛ и гамартомой по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,005$); ² – достоверность разницы у пациентов с гамартомой по сравнению с НМКРЛ ($p < 0,005$); ³ – достоверность разницы у пациентов с I стадией НМКРЛ по сравнению с другими стадиями ($p < 0,005$); ⁴ – достоверность разницы у пациентов с III-IV стадиями НМКРЛ по сравнению со II стадией ($p < 0,005$).

уровень этого показателя в крови увеличивается и в 1,5 раза превышает таковой пациентов с G2.

Корреляционный анализ показателей, существенно измененных в зависимости от характеристик НМКРЛ, демонстрирует связь MFI CXCR1 в гранулоцитах с размером опухоли; уровня CYFRA 21-1 и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2 в крови – с размером опухоли и метастазированием опухоли.

Те показатели, уровень которых значительно увеличился в крови пациентов уже на I и II стадии НМКРЛ, и еще больше возрастал в поздний период заболевания, демонстрируя при этом коррелятивную связь со стадиями и дескрипторами опухоли, вовлекались в последующий ROC-анализ. Его результаты показывают, что определение MFI CXCR1 в гранулоцитах пациентов позволяет выявить ранние стадии НМКРЛ с диагностической чувствительностью 87,4% и специфичностью 73,8% (пороговое значение 26,6). Использование с этой же целью измерения доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, обладает более высокой диагностической чувствительностью (91,8%) при соответствующем пороговом значении (табл. 3, рис.2, а, б, в). Уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови, превышающий пороговое значение 1,6 нг/мл, отмечен у 87,5% пациентов с ранними стадиями НМКРЛ (специфичность – 66,7%).

Указанные выше параметры (доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, MFI CXCR1 в гранулоцитах, уровень CYFRA 21-1 в сыворотке крови) демонстрируют существенные отличия у пациентов с III-IV стадиями НМКРЛ по сравнению как с I, так и со II его стадией. У 89,7% пациентов с уровнем MFI CXCR1 в гранулоцитах выше 47,8 диагностируются поздние стадии заболевания. Определение доли лимфоцитов, снабженных

CXCR2, позволяет выявить III-IV стадии НМКРЛ с еще более высокой диагностической чувствительностью (90,7% при пороговом значении 22,8%). Соответствующий параметр измерения с этой целью концентрации CYFRA 21-1 в сыворотке крови составляет 61,4% (пороговое значение – 4,2 нг/мл) при вероятности истинно отрицательного результата 74,3%.

В попытке дифференцировать I и II стадии заболевания те показатели, уровень которых существенно отличался в крови пациентов со II стадией НМКРЛ по сравнению с I стадией (MFI CXCR1 в гранулоцитах и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2), вовлекались в ROC-анализ. У 75,3% пациентов со II стадией НМКРЛ MFI CXCR1 в гранулоцитах превышает пороговое значение 36,6, а у 69,6% пациентов с уровнем этого показателя меньше 36,6 диагностируется I стадия НМКРЛ. Пороговое значение доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, 18,3% позволяет дифференцировать I и II стадии НМКРЛ с сопоставимой диагностической чувствительностью (75,0%) и несколько большей специфичностью (71,7%).

Обсуждение. Результаты проведенного исследования указывают на существенные изменения уровня CXCL5, CXCL8, CXCR2, и CXCR1 в крови пациентов с НМКРЛ. Все они являются участниками формирования воспаления, неизменно сопровождающего рост злокачественного новообразования. В связи с этим, следовало бы ожидать закономерное увеличение их уровня в крови пациентов по мере распространения опухолевого процесса. Результаты настоящего исследования убедительно свидетельствуют о существенном росте уровня CXCL8 в сыворотке крови, доли гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов, снабженных CXCR1 и CXCR2, а

Таблица 2

Изменение уровня ГК и CYFRA 21-1 в крови пациентов с НМКРЛ в зависимости от дескрипторов опухоли

Показатели	T1	T2	T3	T4	R	95% ДИ
CXCR1, гранулоциты, MFI	32,1 ¹ [22,3;47,2]	48,2 ^{1,2} [40,0;61,8]	55,9 ^{1,2} [47,2;59,3]	87,0 ^{1,2,3,4} [59,4;136,5]	0,519	0,519-0,684
CXCR2, лимфоциты, %	16,6 ¹ [12,2; 18,7]	26,3 ^{1,2} [20,8;32,2]	32,3 ^{1,2,3} [27,9;37,5]	32,1 ^{1,2,3} [28,4;37,4]	0,625	0,621-0,669
CYFRA 21-1, нг/мл	2,7 ¹ [2,0;3,6]	3,8 ^{1,2} [2,5;6,4]	4,2 ^{1,2} [3,2;5,9]	3,9 ¹ [2,7;7,9]	0,279	0,009-0,524
Примечание. ¹ – достоверность разницы у пациентов с T1-4 по сравнению со здоровыми ($p < 0,005$); ² – достоверность разницы у пациентов с T < 3 см по сравнению с T > 3 см ($p < 0,005$); ³ – достоверность разницы у пациентов с T 3-5 см по сравнению с T > 5 см ($p < 0,005$); ⁴ – достоверность разницы у пациентов с T 5-7 см по сравнению с T4 ($p < 0,005$).						
	N0	N1	N2	N3		
CXCR2, лимфоциты, %	20,9 ¹ [16,4; 27,6]	30,3 ¹ [21,3;34,3]	32,5 ^{1,2} [27,3;34,3]	32,0 ¹ [25,9;32,5]	0,476	0,462-0,662
CYFRA 21-1, нг/мл	3,0 ¹ [2,1;4,6]	4,3 ¹ [3,2;7,4]	4,4 ^{1,2} [3,3;8,0]	5,1 ^{1,2} [3,7;7,5]	0,374	0,288-0,599
Примечание. ¹ – достоверность разницы у пациентов с N1-3 по сравнению со здоровыми ($p < 0,005$); ² – достоверность разницы у пациентов с N2-3 по сравнению с N0 ($p < 0,005$).						
	M0		M1			
CXCL8, пг/мл	178,4 ¹ [91,2;295,0]		393,3 ^{1,2} [181,3;691,6]		-	-
CXCR2, лимфоциты, %	25,1 ¹ [16,9;32,1]		29,8 ^{1,2} [23,7;32,5]		-	-
CYFRA 21-1, нг/мл	3,3 ¹ [2,3;5,3]		6,2 ^{1,2} [4,0;10,8]		-	-
CXCR1, лимфоциты, %	12,2 ¹ [7,3;16,4]		19,4 ^{1,2} [9,6;28,4]		-	-
MFI CXCR1, гранулоциты	47,3 ¹ [34,9;61,7]		58,3 ^{1,2} [57,0;63,1]		-	-
Примечание. ¹ – достоверность разницы у пациентов с M0-1 по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,005$); ² – достоверность разницы у пациентов с M1 по сравнению с M0 ($p < 0,017$).						
Показатель	G1	G2	G3			
CXCR2, лимфоциты, %	26,1 ¹ [19,5;29,3]	20,6 ¹ [15,8;30,0]	31,2 ^{1,2} [21,3;32,5]	-	-	-
Примечание. ¹ – достоверность разницы у пациентов с G1-3 по сравнению со здоровыми людьми ($p < 0,008$); ² – достоверность разницы у пациентов с G3 по сравнению с G2 ($p < 0,008$).						

Таблица 3

Результаты ROC-анализа для существенно измененных показателей, коррелятивно связанных с характеристиками НМКРЛ

Показатель/Indicator	I-II стадия НМКРЛ / здоровые люди					
	ПЗ	ДЧ, %	ДС, %	AUC	ДЭ, %	95% ДИ
MFI CXCR1, гранулоциты	26,6	87,4	73,8	0,909	83,8	0,866 – 0,952
CXCR2 лимфоциты, %	11,7	91,8	64,3	0,916	84,2	0,872 – 0,961
CYFRA 21-1, нг/мл	1,6	87,2	66,7	0,818	81,4	0,741 – 0,896
I-II стадия НМКРЛ / III-IV стадия НМКРЛ						
MFI CXCR1, гранулоциты	47,8	89,7	74,8	0,818	81,0	0,759 – 0,878
CXCR2 лимфоциты, %	22,8	90,7	69,1	0,863	78,5	0,811 – 0,914
CYFRA 21-1, нг/мл	4,2	61,4	74,3	0,750	68,7	0,681 – 0,818
I стадия НМКРЛ / II стадия НМКРЛ						
MFI CXCR1, гранулоциты	36,6	75,3	69,6	0,728	73,6	0,627 – 0,828
CXCR2 лимфоциты, %	18,3	75,0	71,7	0,794	74,1	0,712 – 0,876

Примечание. ПЗ – пороговое значение, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ДЭ – диагностическая эффективность, AUC – площадь под ROC-кривой.

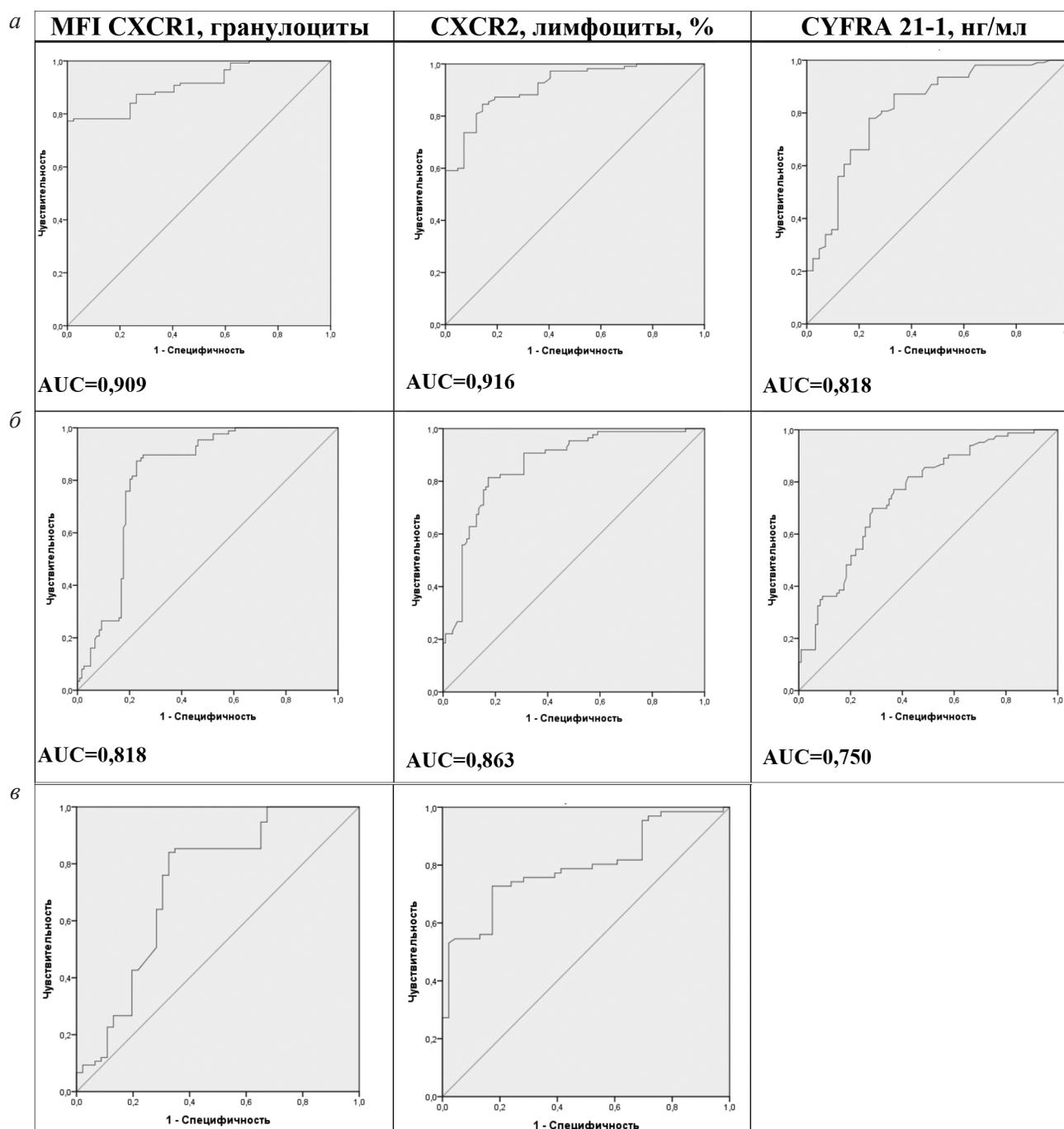


Рис. 2. Графики ROC-кривых для оценки диагностической эффективности определения уровня в крови CYFRA 21-1, MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2.

a – I-II стадии НМКРЛ/здоровые люди; *б* – I-II стадии НМКРЛ/III-IV стадии НМКРЛ; *в* – I стадия НМКРЛ/II стадия НМКРЛ.

также плотности расположения этих рецепторов в клетках крови пациентов с НМКРЛ. В то же время, уровень CXCL5 в сыворотке крови не отличался от такового в обеих контрольных группах. В настоящее время трудно судить о причинах этого явления, однако данные других исследований также указывают на отсутствие существенных изменений уровня этого хемокина в крови при НМКРЛ [20].

Увеличение концентрации рецепторов CXCR1, CXCR2 и хемокина CXCL8 в крови пациентов по мере ро-

ста опухоли, вероятно, отражает усиление сопровождающего его опухолеассоциированного воспаления. Для CXCL8, доли гранулоцитов и лимфоцитов, снабженных CXCR1, MFI CXCR1 и CXCR2 в лимфоцитах оно прослеживается по сравнению со здоровыми людьми и пациентами с гамартомой, начиная со II стадии заболевания и становится еще большим при III-IV стадиях. Уровень этих показателей существенно повышен в крови пациентов уже при I стадии НМКРЛ, однако только по сравнению со здоровыми людьми. По сравнению с

гамартомой легкого такого повышения нет. Отсутствие различий, вероятно, обусловлено не столь значительным инвазивным ростом опухоли при I стадии НМКРЛ. Тем самым, обнаруженные изменения при I стадии имеют, скорее, низкую специфичность.

Теми показателями, которые демонстрируют существенный рост по сравнению с обеими контрольными группами уже на I стадии НМКРЛ, были MFI CXCR1 в гранулоцитах и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2. Косвенным подтверждением наблюдаемых нами изменений являются полученные другими исследователями данные об увеличении уровня гранулоцитов и лимфоцитов (но не моноцитов) в крови пациентов с НМКРЛ по сравнению с доброкачественной опухолью легкого [21].

Обнаруженное повышение MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, в крови пациентов со II стадией НМКРЛ по сравнению с I, вероятно, обусловлено взаимосвязью величины этих показателей с размером опухоли и ее метастазированием в регионарные лимфоузлы. Об этом свидетельствует коррелятивная связь с данными характеристиками опухоли, что было продемонстрировано в предыдущих наших исследованиях [18]. Другими авторами также была обнаружена связь уровня экспрессии CXCR1 и CXCR2 в опухолевой ткани с теми же характеристиками опухоли [22 – 24].

Уровень CXCL8, доля гранулоцитов и лимфоцитов, снабженных рецептором CXCR1, плотность расположения этого рецептора в них (MFI) и доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, наиболее существенно возрастали в крови пациентов в поздний период заболевания. Эти показатели также продемонстрировали существенный рост в крови пациентов с метастазами опухоли во внутренние органы (IV стадией НМКРЛ). В литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи содержания в крови CXCR1 и CXCR2 с наличием отдаленных метастазов НМКРЛ, однако информация об увеличенной концентрации CXCL8 в сыворотке крови пациентов M1 имеется [25].

Данные проведенного исследования демонстрируют существенное изменение доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, у пациентов в зависимости от степени дифференцировки опухоли. Уровень этого показателя был максимален в крови пациентов с G3. Он имел слабую коррелятивную связь со степенью дифференцировки опухолевых клеток. Полученные другими исследователями результаты определения концентрации CXCR2 в клетках НМКРЛ также свидетельствуют о ее взаимосвязи с этим дескриптором [25].

В задачи этой работы входило сравнение обнаруженных изменений с уровнем опухолеассоциированного антигена CYFRA 21-1. Этот биомаркер широко используется в диагностике злокачественных образований самой разной локализации, в том числе, при НМКРЛ [26 – 29]. Его уровень в крови, как и других измеряемых нами показателей, существенно превысил контрольный (как по сравнению со здоровыми людьми, так и с пациентами с гамартомой легкого) уже на I стадии НМКРЛ. Наряду с этим, он не отличался у пациентов с I и II стадиями НМКРЛ, а в поздний период развития опухоли (III-IV стадии) опять вырос. При этом, его уровень зависел от размера и метастазирования опухоли, хотя величина коэффициента корреляции была меньше, чем для MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2.

Результаты исследования дали основание для вовлечения в ROC-анализ тех показателей, которые показали значительные изменения в крови при НМКРЛ, в особенности, на ранних стадиях его развития. Оказалось, что определение MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, имеет сравнительно высокую диагностическую информативность. Их диагностическая эффективность для выявления ранних и поздних стадий заболевания превышает таковую определения CYFRA 21-1. Кроме того, в отличие от CYFRA 21-1, использование MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, позволяет различать I и II стадии НМКРЛ со сравнительно высокой диагностической чувствительностью (75,3% и 75,0%, соответственно) и специфичностью (69,6% и 71,7%, соответственно) при соответствующих пороговых значениях.

Следует отметить, что ни один из определяемых показателей не продемонстрировал одновременно высокой диагностической чувствительности и специфичности при НМКРЛ. Это ограничивает их практическое использование и мотивирует к поиску путей повышения их диагностических параметров. Один из подходов к решению такой проблемы видится в создании диагностической панели с участием MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, в том числе, и в комбинации с CYFRA 21-1. В настоящее время накоплен большой опыт в создании подобных моделей, которые позволили улучшить диагностику целого ряда заболеваний [30, 31].

С другой стороны, НМКРЛ является неоднородным заболеванием и подразделяется на гистологические подтипы (аденокарцинома, плоскоклеточный рак и крупноклеточный рак легкого), которые имеют характерологические особенности течения и метаболических сдвигов в организме [3]. Есть основания предполагать, что изучение динамики изменений избранных нами кандидатов в биомаркеры у пациентов с учетом гистологического подтипа НМКРЛ позволит повысить их диагностическую ценность.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-17, 20-31 см. REFERENCES)

18. Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Прохорова В. И., Готько О. В., Державец Л. А., Мурашко Д. И. Хемокины CXCL5, CXCL8 и их рецепторы CXCR1 CXCR2 – потенциальные биомаркеры немелкоклеточного рака легкого. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2020; 9(3): 252-71.
19. Грижбовский А. М. Анализ трех и более групп количественных данных. *Экология человека*. 2008; 3: 50-8.

REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomatram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021; 71(3): 209-49.
2. Aciti A. G., Erkan L., Findik S., Uzin O., Kandemir B. Clinical features of non-small cell lung cancer cases. *Tuberk. Toraks*. 2004; 150-8.
3. Woodard G., Jones K., Jablons D. Lung cancer staging and prognosis. *Cancer Treat. Res.* 2016; 170: 47-75.
4. Wisnivesky J., Henschke C., McGinn T., Iannuzzi M. Prognosis of stage II non-small cell lung cancer according to tumor and nodal status at diagnosis. *Lung Cancer*. 2005; 49 (2): 181-6.
5. Barlési F., Gimenez C., Torre J., Doddoli C., Mancini J., Greillier L., Roux F., Kleisbauer J. Prognostic value of combination of CYFRA 21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Respir. Med.* 2004; 98(4): 357-62.

6. Nikliński J., Furman M., Chyczewski E., Chyczewska E., Rogowski F., Jaroszewicz E. CYFRA 21-1 new marker for non-small cell lung cancer. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1994; 62(5-6): 227-32.
7. Lei F., Rong W., Ling Y., Xiaopu S., Runtong Z., Pengjun Z. CYFRA21-1 tests in the diagnosis of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *The Int. J. Biol. Markers.* 2019; 34(3): 251-61.
8. Krishna M. S., Krishna M. P., Krishna R. Solution structure of CXCL5 – a novel chemokine and adipokine implicated in inflammation and obesity. *PLOS One.* 2014; 9(4): e93228.
9. Kuo P., Chen Y., Chen T., Shen K., Hsu Y. CXCL5/ENA78 increased cell migration and epithelial-to-mesenchymal transition of hormone-independent prostate cancer by early growth response-1/snail signaling pathway. *J. Cell Physiol.* 2011 May; 226(5): 1224-31.
10. Schalper K., Carleton M., Zhou M., Chen T., Feng Y., Huang S. et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 688-92.
11. Ha H., Debnath B., Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics.* 2017; 7(6): 1543-88.
12. Casilli F., Bianchini A., Gloaguen I., Biordi L., Alesse E., Festuccia C. et al. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 69(3): 385-94.
13. Smith D., Polverini P., Kunkel S., Orringer M., Whyte R., Burdick M.D. et al. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J. Exp. Med.* 1994; 179(5): 1409-15.
14. Arenberg D., Kunkel S., Polverini P., Glass M., Burdick M., Strieter R. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(12): 2792-802.
15. Wu K., Yu S., Liu Q., Bai X., Zheng X., Wu K. The clinical significance of CXCL5 in non-small cell lung cancer. *Oncotargets Ther.* 2017; 10: 5561-73.
16. Chu H., Li W., Li H. C-X-C motif chemokine receptor type 2 correlates with higher disease stages and predicts worse prognosis, and its downregulation enhances chemotherapy sensitivity in triple-negative breast cancer. *Transl. Cancer Res.* 2020; 9(2): 840-8.
17. Bi H., Zhang Y., Wang S., Fang W., He W., Yin L. [et al]. Interleukin-8 promotes cell migration via CXCR1 and CXCR2 in liver cancer. *Oncol. Lett.* 2019; 18(4): 4176-84.
18. Tahanovich A. D., Kauhanka M. M., Prokhorova V. I., Gotko O. V., Derzhavets L. A., Murashka D. I. Chemokines CXCL5, CXCL8 and their receptors CXCR1, CXCR2 as potential biomarkers of non-small cell lung cancer. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa.* 2020; 9(3): 252-71. (in Russian)
19. Grizhbovskiy A. M. Analysis of three or more groups of quantitative data. *Ekologiya cheloveka.* 2008; 3: 50-8. (in Russian)
20. Binwu H., Fan S., Lv X., Chen S., Shao Z. Prognostic significance of CXCL5 expression in cancer patients: a meta-analysis. *Cancer Cell Int.* 2018; 18: 68.
21. Thomson S, Kessler J, Miller T. Leukocyte concentrations in discrimination of benign from malignant lung lesions. *Am. J. Med.* 1986; 80(6): 1035-40.
22. Saintigny P, Massarelli E., Lin S., Ahn Y. H., Chen Y., Goswami S. [et al]. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2013; 73(2): 571-82.
23. Cong L., Qiu Z.Y., Zhao Y., Wang W. B., Wang C. X., Shen H. C., Han J.Q. Loss of β -arrestin-2 and activation of CXCR2 correlate with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *J. Cancer.* 2017; 8(14): 2785-92.
24. Orditura M., De Vita F., Catalano F., Infusino S., Lieto E., Martinelli E. Elevated serum levels of interleukin-8 in advanced non-small cell lung cancer patients: relationship with prognosis. *J. Interferon Cytokine Res.* 2004; 22 (11): 1129-35.
25. Liu Y., Wu B. Q., Geng H., Xu M. L., Zhong H. H. Association of chemokine and chemokine receptor expression with the invasion and metastasis of lung carcinoma. *Oncol. Lett.* 2015; 10(3): 1315-22.
26. Chapman M.H., Sandanayake N.S., Andreola F., Dhar D.K., Webster G.J., Dooley J.S., Pereira S.P. Circulating CYFRA 21-1 is a specific diagnostic and prognostic biomarker in biliary tract cancer. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2011; 1(1): 6-12.
27. Sone K., Oguri T., Nakao M., Kagawa Y., Kurowaka R., Furuta H., Fukuda S. et al. CYFRA 21-1 as a predictive marker for non-small cell lung cancer treated with pemetrexed-based chemotherapy. *Anticancer Res.* 2017; 37(2): 935-9.
28. Shiiya H., Ujiiie H., Hida Y., Kato T., Kaga K., Wakasa S. [et al]. Elevated serum CYFRA 21-1 level as a diagnostic marker for thymic carcinoma. *Thorac. Cancer.* 2021; 12(21): 2933-42.
29. Rastel D., Ramaioli A., Cornillie F., Thirion B. CYFRA 21-1, a sensitive and specific new tumor marker for squamous cell lung cancer. Report of the first European multicentre evaluation. CYFRA 21-1 multicentre study group. *Eur. J. Cancer.* 1994; 30A (5): 601-6.
30. Meisner A., Parikh C.R., Kerr K.F. Biomarker combinations for diagnosis and prognosis in multicenter studies: principles and methods. *Stat. Methods Med. Res.* 2019; 28(4): 969-85.
31. Chen Z., Liu X., Shang X., Qi K., Zhang S. The diagnostic value of the combination of carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma-related antigen, CYFRA 21-1, neuron-specific enolase, tissue polypeptide antigen, and progastrin-releasing peptide in small cell lung cancer discrimination. *Int. J. Biol. Markers.* 2021; 36(4): 36-44.

ИММУНОЛОГИЯ

© РАГИМОВА Р.Р., 2022

Рагимова Р.Р.

АУТОИММУННЫЙ ТИРЕОИДИТ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Азербайджанский медицинский университет, 1022, Баку, Азербайджан

Аутоиммунный тиреоидит это группа органоспецифических аутоиммунных тиреопатий, причиной которых служит генетически обусловленный дефект иммунной толерантности к антигенам щитовидной железы, вследствие чего происходит ее аутоиммунное повреждение. Цель исследования – анализ данных литературы о патогенетической роли генетических и биохимических параметров у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом.

Ключевые слова: обзор; аутоиммунный тиреоидит; генетика; биохимические параметры; цитокины.

Для цитирования: Рагимова Р.Р. Аутоиммунный тиреоидит (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 286-291. DOI:https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-286-291

Для корреспонденции: Рагимова Рена Руфат кызы, канд. биол. наук, ассистент каф. биохимии; e-mail: r.rahimova10@yahoo.com

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.11.2021

Принята к печати 20.12.2021

Опубликовано 21.05.2022

Rahimova R.R.

AUTOIMMUNE THYROIDITIS (REVIEW OF LITERATURE)

Department of Biochemistry, Azerbaijan Medical University, Baku

Autoimmune thyroiditis is a group of organ-specific autoimmune thyroopathies, which are caused by a genetically determined defect in immune tolerance to thyroid antigens, as a result of which its autoimmune damage occurs. The aim of the study was to analyze literature data on the pathogenetic role of genetic and biochemical parameters in patients with autoimmune thyroiditis.

Key words: review; autoimmune thyroiditis; genetics; biochemical parameters; cytokines.

For citation: Rahimova R.R. Autoimmune thyroiditis (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 286-291 (in Russ.). DOI:https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-286-291

For correspondence: Rahimova Rena Rufat, assistant at the Department of Biochemistry; e-mail: r.rahimova10@yahoo.com

Information about author:

Rahimova R.R., <https://orcid.org/0000-0001-6080-0622>.

Conflict of interests. The author declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.11.2021

Accepted 20.12.2021

Published 21.05.2022

Введение. Аутоиммунный тиреоидит это группа органоспецифических аутоиммунных тиреопатий, причиной которых служит генетически обусловленный дефект иммунной толерантности к антигенам щитовидной железы, вследствие чего происходит ее аутоиммунное повреждение.

Более ста лет назад Хакару Хашимото назвал заболевание struma lymphomatosa (лимфаденоидный зоб), которое сегодня названо его именем – тиреоидит Хашимото (ТХ) [1]. Исследователь впервые описал ключевые признаки аутоиммунного тиреоидита (АИТ), в том числе атрофию фолликулярных клеток, лимфоцитарную инфильтрацию, зоб и фиброз. В то время оценка функции щитовидной железы (ЩЖ) была практически недоступна, заболевание считалось весьма редким. Сегодня ясно, что ТХ является составной частью спектра ауто-

иммунных заболеваний, поражающих ЩЖ: от форм, как правило, не требующих лечения (фокальный, тихий и ювенильный тиреоидит), до атрофического тиреоидита, проявляющегося как гипотиреоз без зоба [2–4].

Заболеваемость АИТ составляет 0,3-1,5 на 1000 населения в год, у женщин эта болезнь развивается в 4-10 раз чаще, чем у мужчин.

Диагноз АИТ ставится на основании ряда признаков: наличия антитиреоидных антител, гипеохогенной и неоднородной паренхимы железы по данным ультрасонографии, сочетании повышенного уровня тиреотропного гормона (ТТГ) в плазме крови с нормальным или пониженным уровнем трийодтиронина и тироксина [5].

Согласно исследованиям последних лет заболеваемость АИТ с гипотиреозом или без такового увеличивается. Исследователи затрудняются определить,

с чем связано ее возрастание, является ли подобное увеличение заболеваемости истинным или наблюдается вследствие особенностей дизайна проводимых исследований и использования все более точных методов диагностики [6].

В настоящее время считается общепризнанным, что риск развития ТХ обусловлен комбинацией генетической предрасположенности и факторов окружающей среды, которые способствуют нарушению иммунологической толерантности и развитию аутоиммунной реакции в отношении тканей щитовидной железы.

Генетическая предрасположенность и роль генетических полиморфизмов в развитии аутоиммунного тиреоидита. Генетические факторы играют определенную роль в развитии ТХ, что было неоднократно продемонстрировано в эпидемиологических исследованиях. Об этом свидетельствуют:

- семейный характер АИТ (в 20-30% случаев заболевание развивается у братьев и сестер пациентов, величина отношения шансов (ОШ) составляет 16;
- высокая конкордантность АИТ у монозиготных близнецов (29-55%, у дизиготных близнецов – 0 -7%);
- наличие циркулирующих аутоантител (АТА) примерно у 50% братьев и сестер пациентов [7].

В исследовании М. Simmonds и соавт. [8] было продемонстрировано наличие взаимосвязи между АИТ, наличием АТА и полиморфизмами некоторых генов (IL2RA, ген человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), RTPN22 и CTLA4. В исследованиях по типу случай-контроль были определены и другие гены, связанные с развитием АИТ (FCRL3, рецептор тиреотропного гормона ТТГ (рТТГ) и HLA класса I). В геномных исследованиях подтверждена их связь с аутоиммунными заболеваниями ЩЖ [8].

В патогенезе АИТ была продемонстрирована важная роль гена тиреоглобулина (Tg), расположенного в 8-й хромосоме [9]. Выявлена значительная ассоциация между определенными аминокислотными вариантами тиреоглобулина (ТГ) и вероятностью развития АИТ.

Установлено, что высокий риск АИТ характерен для людей с однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) на уровне экзона 33 гена Tg, а также с DRb1- Arg74 (вариант HLA-DR, который содержит аргинин в 74-й позиции) [10].

Увеличивается объем данных, свидетельствующий о потенциальной роли эпигенетических модификаций в развитии аутоиммунного процесса при патологии ЩЖ. Так, у пациентов с АИТ было выявлено гипометилирование гена ICAM-1 [11].

Недавние исследования предрасположенности к ТХ выявили ряд новых аспектов. Результаты исследований, проведенных на военнослужащих США свидетельствуют, что максимальная заболеваемость ТХ характерна для европеоидов, минимальная – для представителей негроидной расы, а также жителей островов Азиатско-Тихоокеанского региона [12]. Выявленные различия могут быть результатом влияния генетических факторов и/или факторов окружающей среды.

Понимание причины столь выраженных этнических тенденций могло бы углубить представления о факторах предрасположенности к развитию ТХ.

В настоящее время активно проводятся исследования по поиску генов, ответственных за ТХ, как с использованием методов выявления генов-кандидатов, так и с помощью полногеномного поиска ассоциаций. Эти

гены в широком смысле могут быть классифицированы на те, которые контролируют иммунный ответ, и те, которые являются специфичными для развития патологии ЩЖ. При работе по первому направлению было проведено изучение генов архетипического иммунного ответа, кодируемыми в составе HLA (главного комплекса гистосовместимости). Использование семейного подхода и дизайна «случай-контроль» позволило установить, что аллель HLA-B*46:01 ассоциирован с повышенным риском развития ТХ у китайских детей ханьского происхождения [13]. При обследовании выборки из 444 японских пациентов с ТХ было определено, что гаплотипы HLA-A*02:07 и HLA-DRB4 предрасполагают к развитию ТХ, тогда как гаплотипы HLA-A*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02-DQB1*06:04-DPB1*04:01, напротив, «защищают» от проявления этого заболевания [14].

В контролируемом исследовании с 75 пациентами европеоидной расы с ТХ было показано, что наличие гена HLA-A2 не обеспечивает «защиту» от аутоиммунного тиреоидита, но ассоциировано с отсутствием случаев развития БГ [15].

К настоящему времени у большинства исследователей сформировалось понимание того, что генетика ТХ гораздо сложнее, чем считалось ранее. Полученные результаты подчеркивают сложность изучения даже одного набора генов, способствующего развитию заболевания или обладающего защитными эффектами [14]. Очевидна необходимость проведения дальнейших исследований для понимания механизмов эффекта определенных однонуклеотидных полиморфизмов в отношении развития заболевания. Поскольку наличие ассоциации не является подтверждением причинно-следственной связи, необходимо изучение взаимодействия генетических факторов друг с другом, также с факторами окружающей среды.

Иммунопатогенез тиреоидита Хашимото. В настоящее время общепризнанной является роль нарушений клеточного и гуморального иммунитета в развитии аутоиммунных заболеваний ЩЖ, в том числе ТХ. Накоплен большой материал о роли различных биологически активных веществ в проявлениях заболевания, которые, участвуя в нарушениях регуляции, патогенетических сигнальных каскадах, могут выступать одновременно в качестве различного рода маркеров и факторов прогноза АИТ.

Известно, что аутоиммунные заболевания ЩЖ сопровождаются Т- и В-лимфоцитарной инфильтрацией железистых тканей. При аутоиммунном тиреоидите Т-лимфоциты мигрируют из периферического кровотока в ткань ЩЖ и активно участвуют в реализации аутоиммунного процесса.

Лимфоцитарная инфильтрация ЩЖ способствует постепенному замещению функциональных тканей железы вследствие атрофии тиреоцитов и фиброза [16]. В ряде исследований показано снижение содержания в периферической крови пациентов с АИТ субпопуляций Т-лимфоцитов с фенотипами CD3+ (Т-лимфоцитов общих), CD4+ (хелперов), снижение CD8+ (цитотоксических лимфоцитов), наряду с увеличением иммунорегуляторного индекса CD4+/CD8+ [17]. Наряду с этим отмечено увеличение процентного содержания лимфоцитов, увеличение количества клеток, несущих детерминанты CD3+, CD4+, CD8+ и CD 16+ (NK-клеток – естественных киллеров) наряду с уменьшением абсо-

лютного и относительного количества CD 19+ лимфоцитов – В-клеток [18].

При АИТ у больных обнаруживаются антитела к различным аутоантигенам цитоплазмы тироцита или поверхностной мембраны коллоида. В патогенез заболевания могут вовлекаться различные тиреоидные компоненты, установлено, что антигенная структура ЩЖ насчитывает более 10 клеточных и коллоидных антигенов [19].

Практически у всех пациентов с ТХ присутствуют антитела к ТГ и ТПО. Помимо диагностической роли, оценка уровней АтТПО позволяет прогнозировать развитие гипотиреоза, особенно в сочетании с измерениями уровня ТТГ [20].

АтТПО используется для диагностики тиреоидита и иных заболеваний ЩЖ [21]. Этот вид циркулирующих антител выявляется примерно у 80-90% пациентов с АИТ и у 50-60% пациентов с БГ. Чувствительность определения АтТПО при диагностике АИТ составляет 90%.

В проспективном исследовании, выполненном J. Orgiazzi [21] было показано, что положительный результат теста на АтТПО является предиктором прогрессирования субклинического гипотиреоза и развития симптомов заболевания. Кроме того, у женщин с АтТПО наблюдается повышенный риск развития послеродового тиреоидита. Показана важная роль АтТПО в иммуннопатогенезе гипотиреоза, установлено, что эти антитела способствуют усилению клеточной цитотоксичности, опосредованной натуральными киллерами (NK), а также комплемент-зависимой цитотоксичности. Эти изменения в свою очередь приводят к гибели тироцитов и атрофии железы.

Известно, что синтез тиреоидных гормонов (Т4 и Т3) зависит от активности тиреопероксидазы, которая представляет собой гликозилированный гемопротейн с молекулярной массой 107 кДа. Функцией данного фермента является йодирование ТГ и соединение йодотирониновых остатков. Антитела к ТПО распознают конформационные эпитопы, расположенные, в частности, в иммуногенной области, которая состоит из двух пересекающихся регионов А и В. Последний представляет собой основную мишень для АтТПО, и, вероятно, всего, выступает в качестве стартового эпитопа в патогенезе АИТ [22].

АтТГ выявляются у 60-80% пациентов с АИТ и у 40-60% пациентов с БГ. Чувствительность теста на АтТГ варьирует пределах 30-50%. По данным проспективного исследования, АтТГ не обладают прогностической ценностью в отношении прогрессирования субклинического гипотиреоза. Низкоаффинные IgG и IgM к ТГ определяются у людей, не страдающих АИТ. АтТГ классов IgG1 и IgG4 не способны к активации комплемента и, как следствие, не способствуют развитию гипотиреоза при АИТ [21].

При рассмотрении особенностей гуморального иммунитета при АТ следует учитывать и такой аспект, как уровни антител к натрий-йод симпортеру (НИС) и пендрину. Натрий-йод симпортер – трансмембранный белок, участвующий в поглощении йодида в фолликулярных клетках щитовидной железы, который играет важнейшую роль в метаболизме йода, его определение используется в диагностике и лечении ряда заболеваний ЩЖ [23].

НИС обеспечивает захват йода ЩЖ, в то время как пендрин прохождение йодид-ионов через тироциты. Антитела к НИС определяются у 17-31% пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы.

В некоторых случаях данные антитела способны подавлять активность симпортера *in vitro* [24]. Антитела к пендрину определяются только у 9-11% пациентов с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы [25]. Антитела к НИС и пендрину при ТХ определяются несколько реже, чем при БГ, и минимальное различие их уровней свидетельствует о том, что эти антитела не оказывают значимое влияние на клиническую картину [23].

Значение активности антител к ДНК при аутоиммунном тиреоидите. В последние годы исследователи обращают внимание на феномен гетерогенности антитиреоидных АТ, который обусловлен разнообразием эпитопной архитектоники молекул аутоантигенов ткани ЩЖ. При этом на ранних стадиях заболевания антитиреоидные АТ могут вырабатываться на индуцирующее действие не только органоспецифичных аутоантигенов, но и перекрестно-реагирующих антигенных детерминант. Для этих АТ характерен относительно низкий уровень специфичности и аффинности, тем не менее, связываясь с клетками железы аутоантитела проявляют свое цитотоксическое действие. В ходе прогрессирования АИТ все больше становится высокоспецифичных антитиреоидных АТ, направленных против органоспецифичных аутоантигенов [26].

W.C. Kung, H.P. Ng [27] рассматривают ТПО в качестве аутоантигена, ответственного за развитие тиреоидита с лимфоцитарной инфильтрацией и дисфункции железы. Авторы считают, что идентификация иммунодоминантных эпитопов тиреопероксидазы (ТПО) позволит разработать таргетную терапию, направленную на ингибирование гипотиреоза при АИТ. Другие исследователи также предпринимали попытки идентификации иммунодоминантных регионов эпитопов ТПО.

В исследованиях последних лет было продемонстрировано наличие природных антител, обладающих способностью катализировать ряд реакций в процессе гомеостаза, которые были названы «абзимы» – каталитические антитела. Охарактеризованы природные абзимы, для которых установлена протеолитическая, пероксидазная, оксидоредуктазная, протеинкиназная, фосфатазная, ДНКазная и РНКазная активность. Эти АТ обнаруживают у 1-2 % здоровых людей.

Особое внимание исследователей привлекло изучение антител с ДНК-гидролизующей активностью, которые были выявлены в сыворотке крови больных с аутоиммунными заболеваниями, в частности, при рассеянном склерозе, системной красной волчанке, аутоиммунном гепатите синдроме Шегрена, болезни Грейвса, при ряде вирусных (вирусный гепатит, СПИД) и лимфопролиферативных заболеваниях. Появление абзимом к ДНК рассматривается в настоящее время в качестве фактора прогноза аутоиммунной патологии. В отличие от нативной ДНК с нуклеосомами эффективно связываются до 99% суммарного пула изначально патогенных аутоантител к ДНК. В целом, большинство авторов предполагают, что образование ДНК-связывающих ААТ обусловлено циркулирующими в крови нуклеосомами, в свою очередь повышение концентрации последних обусловлено интенсивным апоптозом, что, как отмечено выше, характерно для АИТ [28].

Способность вырабатывать АТ к хроматину, ДНК и нуклеосомам в значительной мере обусловлена генетической предрасположенностью. В.Р. Tsao и соавт. [29] обратили внимание на локус q41-42 хромосомы 1 у человека, рассматривая его как ген, ответственный за

продукцию АТ к хроматину. По данным ряда авторов, антитела, которые связываются только с нативной ДНК (нДНК) являются редкими, большинство АТ к нДНК связываются как с нДНК, так и с денатурированной ДНК (дДНК).

Ряд авторов рассматривают ААТ к дДНК (иммуноглобулины класса М) рассматривают в качестве постоянного компонента иммунного ответа, приписывая им определенный спектр физиологических функций – сохранение баланса между состоянием здоровья и аутоиммунными заболеваниями [30]. D. Pisetsky [31] выдвинули гипотезу, согласно которой первоначальной функцией ААТ к ДНК выступает защита организма от чужеродных ДНК, в первую очередь различных бактерий и вирусов.

Установлено, что АТ к нДНК образуют иммунные комплексы с ДНК, которые могут оседать в гломерулах почек, что способствует повреждению тканей почки. Также подобные АТ могут, проникая через мембрану клетки, связываться с цитоплазматическими или ядерными структурами. Таким образом, реализуется влияние этого класса антител на синтез белка, пролиферацию клетки и апоптоз [30, 32].

A. V. Kozug и соавт. [33] считают, что при аутоиммунном тиреоидите (АИТ) антитела с протеолитической активностью, гидролизующие тиреоглобулин, рассматриваются как защитный фактор, который снижает аутоиммунную агрессию и предотвращает инфильтрацию ткани железы иммунными комплексами.

Изучая патогенетическую роль ДНК-связывающих антител, исследователи находят доказательства не только их каталитических, но и цитотоксических свойств. Реализация цитотоксического потенциала ДНК-абзимов возможна как минимум двумя процессами – путем апоптоза и путем прямого комплементнезависимого цитотоксического действия на клетку. Г.А. Невинским и соавт. [34] были проведены исследования ДНК-гидролизующей активности IgG-АТ в сыворотке больных АИТ и нетоксическим узловым зобом. Было показано, что уровень каталитической активности ДНК-абзимов возрастает параллельно с увеличением концентрации в сыворотке крови тиреоглобулина и антител к ТГ. При этом все сыворотки крови больных, находящихся в состоянии гипотиреоза, характеризовались высоким уровнем активности ДНК-абзимов.

Заместительная терапия больных гормоном тироксином приводила к нормализации лишь концентрации тиреоидных гормонов в крови и не влияла на уровень ДНК-гидролизующих АТ, тогда как лечение иммунодепрессантом плаквенилом приводило к значительному снижению уровня каталитической активности ДНК-АТ и улучшению функции щитовидной железы, что выразилось в повышении концентрации тиреоидных гормонов в крови [35].

Таким образом, изучение каталитических АТ к ДНК может внести новые данные в понимание вопросов возникновения и развития аутоиммунных нарушений при АИТ, а также представить дополнительные возможности решения диагностических и лечебных задач.

Уровни иммунорегуляторных белков (альфа-2-макроглобулина) в крови при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Было изучено содержание ТТГ, свободного Т4 (свТ4) и ряда иммунорегуляторных белков – альфа-2-макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ), лактоферрина (ЛФ), альфа-1-антитрипсина ($\alpha 1$ -АТ) и цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИФН- γ) в крови 50 женщин с диффузным

токсическим зобом (ДТЗ) и 35 пациенток с АИТ до и после лечения. Полученные данные авторы сравнивали с соответствующими показателями у 30 здоровых женщин. При гипотиреозе в исходе АИТ выявлена гиперцитокинемия с повышенным содержанием $\alpha 2$ -МГ. В этой связи интерес представляет изучение иммунорегуляторных белков в физиологических, а также в воспалительных процессах, контролирующих клеточную пролиферацию и апоптоз. Кроме того, $\alpha 2$ -МГ и ЛФ потенциально иммуногенны; концентрация их комплексов с IgG повышается при воспалительных и особенно аутоиммунных заболеваниях [36]. $\alpha 2$ -МГ является ингибитором протеиназ, высвобождающихся при воспалении, транспортером гормонов и цитокинов, участвует в распознавании и презентации инфекционных антигенов, регуляции пролиферации и апоптоза, ремоделировании тканей [37].

Избыток цитокинов (особенно ИЛ-6 для $\alpha 2$ -МГ и хемокина ИЛ-8 для ЛФ) активирует синтез этих белков. При этом выраженное воспаление приводит к окислению молекул $\alpha 2$ -МГ и их накоплению в циркуляции, что наблюдалось в рамках нашего исследования. Подобные дефектные формы обладают измененным сродством к рецепторам и транспортируемым цитокинам. К этим молекулам синтезируются аутоантитела, и не подлежит сомнению, что накопление $\alpha 2$ -МГ при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы (в норме $\alpha 2$ -МГ — негативный реактант воспаления) за счет дефектных форм крайне негативным образом сказывается на всех физиологических и патологических процессах, контролируемых данным белком, включая стимуляцию синтеза цитокинов [36].

Таким образом, к настоящему времени установлено, что при гипотиреозе в исходе АИТ выявлена выраженная гиперцитокинемия, сопровождаемая повышенным содержанием иммунорегуляторных $\alpha 2$ -МГ и ЛФ.

Результаты исследований матриксных металлопротеиназ при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы. Матриксные металлопротеиназы (ММП) внеклеточного матрикса (ВКМ) представляют собой группу из 28 цинк-зависимых эндопептидаз, которые задействованы в пролиферации, миграции, дифференцировке, ангиогенезе, апоптозе и иммунной защите организма [37].

Внутри семейства ММП выделяют 6 больших групп в соответствии со структурными особенностями и типами субстратов: 1) коллагеназы, 2) желатиназы, 3) стромелизины, 4) матрилизины, 5) ММП мембранного типа, 6) все остальные ММП.

В нормальных тканях концентрации ММП очень низкие, однако их экспрессия может увеличиваться под действием воспалительных цитокинов, гормонов, факторов роста и межклеточных взаимодействий. Данные процессы регулируются рядом факторов, в том числе тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП).

ММП играют важнейшую роль в развитии патологических процессов при этих заболеваниях, способствуя деградации матрикса вследствие нарушения баланса между активностью ферментов и их специфических ингибиторов. ТИМП играют важную роль в поддержании тонкого баланса между образованием и утилизацией ВКМ, поэтому изменения их концентраций могут служить признаком начинающихся дисфункций и патологических процессов [38].

ММП играют ключевую роль в ремоделировании ВКМ и задействованы в ряде процессов, в том числе в

воспалении, миграции и дифференцировке клеток, ангиогенезе и фиброзе. Некоторые металлопротеиназы экспрессируются постоянно (ММР-2), в других случаях экспрессия носит индуцируемый характер (ММР-9), синтез этих ферментов зависит от множества факторов.

К настоящему времени продемонстрирована клиническая значимость ММР-2 и ММР-9 при новообразованиях, аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваниях, установлено, что повышенная продукция ММР-3 и ММР-9 является маркером ряда онкологических заболеваний (например, множественной миеломы) [39].

В доступной литературе представлены отдельные сведения о роли ММР и ТМР в аутоиммунных заболеваниях ЩЖ, в частности, в развитии БГ.

Известно, что в начальной стадии развития БГ преобладает воспалительная реакция, которая сменяется интенсивным ремоделированием соединительной ткани, накопление макромолекул ВКМ и фиброзом [40]. Показано, что терапия глюкокортикоидами сопровождается снижением уровня ММР-9 в плазме пациентов с БГ, но при этом уровень ММР-2 не изменяется [41].

В настоящее время не установлено, какая именно металлопротеиназа, ММР-2 или ММР-9, определяет фенотип заболевания и наличие или отсутствие орбитопатии.

Было показано, что концентрации всех изученных биологически активных веществ значительно снижались после эффективного лечения, и это свидетельствует не только о том, что ММР и их ингибиторы участвуют в патогенезе БГ, а также о том, что активность их продукции коррелирует с активностью заболевания.

Проведенный анализ литературных данных показывает, что тиреодит Хашимото, наиболее распространенная разновидность АИТ, является ведущей причиной гипотиреоза. Развитие заболевания обусловлено комбинацией генетических факторов и влияниями факторов окружающей среды, приводящими в итоге к потере иммунологической толерантности. Поэтому очевидной представляется изучение эпигенетической роли факторов окружающей среды в патогенезе ТХ.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4-16, 19-33. 38-41 см. REFERENCES)

2. Болдырева Ю.В., Лебедев И.А., Кручинин Е.В., Алекберов Р.И., Тарасов Д.О., Тяпкин А.В. и др. Единый подход к ведению пациентов с аутоиммунным тиреодитом (литературный обзор). *Уральский медицинский журнал*. 2019; 7(175):110-3.
3. Рожко В.А. Современное состояние проблемы аутоиммунного тиреодита. *Проблемы здоровья и экологии*. 2019; 2(60): 4-13.
17. Шарипова З.Ф., Фархутдинова Л.М., Кильсенбаева Ф.А. Зависимость функции щитовидной железы от степени выраженности аутоиммунного компонента. *Медицинская иммунология*. 2006; 8(2-3): 239.
18. Кадричева С.Г., Савченко А.А. Предикция уровня аутоантител у больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы с использованием уровней метаболических ферментов лимфоцитов крови. *Медицинская иммунология*. 2001; 3(2):182.
34. Невинский Г.А., Канышкова Т.Г., Семенов Д.В., Бунева В.Н. Калитически активные антитела и их возможная биологическая функция. *Вестник РАМН*. 2001; 2:38-45.
35. Бреусов А.А., Гальвита А.В., Бензо Е.С. Сравнение уровня активности поликлональных ДНК-гидролизующих антител у пациентов с аутоиммунным тиреодитом и нетоксическим узловым зобом. *Russian Journal of Immunology*. 2001; 6:17-28.

36. Зорина В.Н., Трофименко Н.А., Архипова С.В., Зорина Р.М., Зорин Н.А. Комплексы альфа-2-макроглобулина с антителами класса G, плазмином и их взаимосвязь с другими факторами гуморального иммунитета при развитии ревматоидного артрита. *Медицинская иммунология*. 2005; 7(5-6):557-562.
37. Зорин Н.А., Зорина В.Н. Сигнальная система макроглобулинов. Обзор литературы. *Биомедицинская химия*. 2012; 58(4):400-10. DOI:10.18097/pbmc20125804400.

REFERENCES

1. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Arch. Lin. Chir.* 1912; 97:219-48.
2. Boldyreva Yu.V., Lebedev I.A., Kruchinin E.V., Alekberov R.I., Tarasov D.O., Tyapkin A.V. et al. A unified approach to the management of patients with autoimmune thyroiditis (literature review). *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; 7(175):110-3. (in Russian)
3. Rozhko V.A. The current state of the problem of autoimmune thyroiditis. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2019;2(60): 4-13. (in Russian)
4. Mattozzi S., Sabater L., Escudero D., Arino H., Armangue T., Simabukuro M. et al. Hashimoto encephalopathy in the 21st century. *Neurology*. 2020; 94(2):217-24. DOI: 10.1212/WNL.0000000000008785.
5. Caturegli P., De R.A., Rose N.R. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun. Rev.* 2014; 13(4-5):391-7. DOI:10.1016/j.autrev.2014.01.007.
6. Latina A., Gullo D., Trimarchi F., Benvenega S. Hashimoto's thyroiditis: similar and dissimilar characteristics in neighboring areas. Possible implications for the epidemiology of thyroid cancer. *PLoS One*. 2013; 8: e55450.
7. Tomer Y., Davies T.F. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocrine Reviews*. 2003; 24(5): 694-717. DOI:10.1210/er.2002-0030.
8. Simmonds M.J. GWAS in autoimmune thyroid disease: redefining our understanding of pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2013; 9(5): 277-87. DOI:10.1038/nrendo.2013.56.
9. Tomer Y., Hasham A., Davies T.F., Stefan M., Concepcion E., Keddache M. et al. Fine mapping of loci linked to autoimmune thyroid disease identifies novel susceptibility genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(1):144-52. DOI: 10.1210/jc.2012-2408.
10. Hodge S.E., Ban Y., Strug L.J., Greenberg D.A., Davies T.F., Concepcion E.S. et al. Possible interaction between HLA-DRbeta1 and thyroglobulin variants in Graves' disease. *Thyroid*. 2006; 16(4): 351-5. DOI: 10.1089/thy.2006.16.351.
11. Shalaby S.M., Mackawy A.M.H., Atef D.M., Atef R.M., Saeed J. Promoter methylation and expression of intercellular adhesion molecule 1 gene in blood of autoimmune thyroiditis patients. *Molecular biology reports*. 2019; 46: 5345-53. DOI:10.1007/s11033-019-04990-6.
12. McLeod D.S., Caturegli P., Cooper D.S., Matos P.G., Hutfless S. Variation in rates of autoimmune thyroid disease by race/ethnicity in US military personnel. *JAMA*. 2014; 311(15):1563-5. DOI: 10.1001/jama.2013.285606.
13. Huang C.Y., Chang T.Y., Chu C.C., Lo F.S., Ting W.H., Lin C.H. et al. The HLA-B gene and Hashimoto disease in Han Chinese children: a case-control and family-based study. *Tissue Antigens*. 2012; 80(5): 431-6. DOI:10.1111/tan.12003.
14. Ueda S., Oryoji D., Yamamoto K., Noh J.Y., Okamura K., Noda M. et al. Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(2): 379-83.
15. Bernecker C., Ostapczuk M., Vordenbaumen S., Ehlers M., Thiel G., Schinner S. et al. HLA-A2 phenotype may be protective against Graves' disease but not against Hashimoto's thyroiditis in Caucasians. *Horm. Metab. Res.* 2013; 45(1):74-7. DOI: 10.1055/s-0032-1323704.
16. Antonelli A., Ferrari S.M., Corrado A., Di Domenicantonio A., Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2015; 14(2):174-80. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.10.016.
17. Sharipova Z.F., Farkhutdinova L.M., Kilsenbaeva F.A. Dependence of the function of the thyroid gland on the severity of the autoimmune component. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006; 8(2-3):239. (in Russian)

18. Kadricheva S.G., Savchenko A.A. Prediction of the level of autoantibodies in patients with autoimmune diseases of the thyroid gland using the levels of metabolic enzymes of blood lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya*. 2001; 3(2):182. (in Russian)
19. Witte T.T., Hartung K., Sachse C., Matthias T., Fricke M., Deicher H. et al. IgM anti-ds DNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. SLE Study Group. *Rheumatology international*. 1998; 18(3): 85-91.
20. Weetman A.P. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto. *Eur. Thyroid. J.* 2013; 1(4): 243–50.
21. Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse medicale*. 2012; 41(12): 611-25. DOI:10.1016/j.lpm.2012.10.002.
22. Dubska M., Banga J.P., Plochocka D., Hoser G., Kemp E.H., Gardas A. et al. Structural insights into autoreactive determinants in thyroid peroxidase composed of discontinuous and multiple key contact amino acid residues contributing to epitopes recognized by patients' autoantibodies. *Endocrinology*. 2006; 147(12): 5995-6003. DOI:10.1210/en.2006-0912.
23. Ajjan R.A., Kemp E.H., Waterman E.A., Watson P.F., Endo T., Onaya T. et al. Detection of binding and blocking autoantibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85(5):2020–7. DOI:10.1210/jcem.85.5.6526.
24. Kakudo K., Li Y., Hirokawa M., Ozaki T. Diagnosis of Hashimoto's thyroiditis and IgG4-related sclerosing disease. *Pathol. Int.* 2011; 61(4):175–83. DOI:10.1111/j.1440-1827.2011.02661.x.
25. Kemp E.H., Sandhu H.K., Watson P.F., Weetman A.P. Low frequency of pendrin autoantibodies detected using a radioligand binding assay in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013; 98(2): 309–13. DOI:10.1210/jc.2012-3683.
26. Chiovato L.L., Latrofa F., Braverman L.E., Pacini F., Cappezzone M., Masserini L. et al. Disappearance of humoral thyroid autoimmunity after complete removal of thyroid antigens. *Ann. Intern. Med.* 2003; 2 (139):346-51. DOI:10.7326/0003-4819-139-5_Part_1-200309020-00010.
27. Bresson D., Rebuffat S., Peraldi-Roux S. Localization of the immunodominant region on human thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease: an update. *J. Autoimmune Dis.* 2005; 2(1):2. DOI:10.1186/1740-2557-2-2.
28. Bijl M., Horst G., Limburg P.C., Kallenberg C.G. Anti-CD3-induced and anti-Fas-induced apoptosis in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* 2001; 123(1):127-32. DOI:10.1046/j.1365-2249.2001.01418.x.
29. Tsao B.P., Cantor R.M., Kalinian K.C. Evidence for linkage of a candidate chromosome I region to human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:725-31.
30. Lacroix-Desmazes S.S., Bayry J., Misra N., Horn M.P., Villard S., Pashov A. et al. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A. *New Engl. J. Med.* 2002; 346(9):662-7. DOI:10.1056/NEJMoa011979.
31. Pisetsky D.S. Specificity and immunochemical properties of antibodies to bacterial DNA. *Methods*. 1997; 11(1): 55 – 61. DOI:10.1006/meth.1996.0387.
32. Pedro A.B., Romaldini J.H., Americo C., Takei K. Association of circulating antibodies against double-stranded and single-stranded DNA with thyroid autoantibodies in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis patients. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 2006; 114(1):35 – 8. DOI:10.1055/s-2005-873005.
33. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Aleksandrova E.S., Sashchenko L.P., Gnuchhev N.V., Favorov P.V. et al. Novel functional activities of anti-DNA autoantibodies from sera of patient with lymphoproliferative and autoimmune disease. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1998; 75(1):45-61. DOI:10.1007/BF02787708.
34. Nevinsky G.A., Kanyshkova T.G., Semenov D.V., Buneva V.N. Catalytically active antibodies and their possible biological function. *Vestnik RAMN*. 2001; 2:38-45. (in Russian)
35. Breusov A.A., Galvita A.V., Benzo E.S. Comparison of the activity level of polyclonal DNA hydrolyzing antibodies in patients with autoimmune thyroiditis and non-toxic nodular goiter. *Russian Journal of Immunology*. 2001; 6:17-28. (in Russian)
36. Zorina V.N., Trofimenko N.A., Arkhipova S.V., Zorina R.M., Zorin N.A. Complexes of alpha-2-macroglobulin with antibodies of class G, plasmin and their relationship with other factors of humoral immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2005; 7(5-6):557-62. (in Russian)
37. Zorin N.A., Zorina V.N. Macroglobulin signaling system. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2012; 58(4):400-10. DOI:10.18097/pbmc20125804400 (in Russian)
38. Fiedorczyk M., Klimiuk P.A., Sierakowski S., Gindzienska-Sieskiewicz E., Chwiecko J. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2006; 33(8):1523-9.
39. Urbaniak-Kujda D., Kapelko-Slowik K., Prajs I., Dybko J., Wolowicz D., Biernat M. et al. Increased expression of metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2, MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1, TIMP-2), and EMMPRIN (CD147) in multiple myeloma. *Hematology*. 2016; 21(1):26-33. DOI:10.1179/1607845415Y.0000000043.
40. Tsai C.C., Wu S.B., Chang P.C., Wei Y.H. Alteration of connective tissue growth factor (CTGF) expression in orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy. *PLoS One*. 2015; 10 (11): e0143514. DOI:10.1371/journal.pone.0143514.
41. Myśliwiec J., Adamczyk M., Pawłowski P., Nikolajuk A., Górska M. Serum gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and VCAM-1 as a guideline in a therapeutic approach in Graves ophthalmopathy. *Endokrynol. Pol.* 2007; 58 (2):105–9.

Бутина Е.В., Шерстнев Ф.С., Максимов О.Д., Йовдий А.В., Парамонов И.В.

РОЛЬ ГЕНОВ HLA В РАЗВИТИИ HLA-АЛЛОИММУНИЗАЦИИ У РЕЦИПИЕНТОВ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА, 610027, Киров, Россия

*Установлена генетически обусловленная предрасположенность к развитию HLA-аллоиммунизации при проведении ге-мокомпонентной терапии, ассоциированная с наличием в генотипах реципиентов HLA-аллелей DRB1*04, DQA1*03:01, DQA1*05:01 и трехлокусного гаплотипа DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02. Риск образования антилимфоцитар-ных антител снижен у пациентов с HLA аллелями DRB1*16, DQA1*01:02, DQB1*05:02 и HLA-гаплотипом DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02.*

Ключевые слова: HLA; гены; антигены; аллоантитела; аллоиммунизация; трансфузии тромбоцитов.

Для цитирования: Бутина Е.В., Шерстнев Ф.С., Максимов О.Д., Йовдий А.В., Парамонов И.В. Роль генов HLA в раз-витии HLA-аллоиммунизации у реципиентов компонентов крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022; 67 (5): 292-295. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-292-295>

Для корреспонденции: Бутина Елена Владимировна, д-р мед. наук, зав. лаб. иммуногематологии; e-mail: butinalena@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 14.12.2021

Принята к печати 15.01.2022

Опубликовано 21.05.2022

Butina E.V., Sherstnev F.S., Maksimov O.D., Yovdiy A.V., Paramonov I.V.

ROLE OF HLA GENES IN DEVELOPMENT OF HLA-ALLOIMMUNIZATION IN BLOOD RECIPIENTS

Federal State Budget Institution of Science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency», 610027 Kirov, Russian Federation

*A genetically determined predisposition to the development of HLA-alloimmunization as a result of blood transfusions is as- sociated with the presence of HLA-alleles DRB1*04, DQA1*03:01, DQA1*05:01 and HLA-haplotype DRB1*04-DQA1*03:01- DQB1*03:02 in the genotypes of recipients. The risk of antibody production is reduced in patients with HLA-alleles DRB1*16, DQA1*01:02, DQB1*05:02 and HLA-haplotype DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02.*

Key words: HLA; gens; antigens; alloantibodies; alloimmunization; platelet transfusion.

For citation: Butina E.V., Sherstnev F.S., Maksimov O.D., Yovdiy A.V., Paramonov I.V. Role of HLA genes in development of HLA-alloimmunization in blood recipients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnos- tics).* 2022; 67 (5): 292-295 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-292-295>

For correspondence: Butina E.V., Dr. Sci. Med., head of the Laboratory of Immunohematology; e-mail: butinalena@yandex.ru

Information about authors:

Butina E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7474-7559>;

Sherstnev F.S., <https://orcid.org/0000-0002-1751-8522>;

Maksimov O.D., <https://orcid.org/0000-0003-4011-8428>;

Yovdiy A.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>;

Paramonov I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7205-912X>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 14.12.2021

Accepted 15.01.2022

Published 21.05.2022

Введение. Основными неблагоприятными послед-ствиями HLA-аллоиммунизации являются неэффе-ктивность трансфузий концентратов тромбоцитов, необхо-димность дополнительных переливаний тромбоцитов, фебрильные реакции и угроза развития фатального кровотечения [1-3]. Наиболее эффективным методом профилактики считается лейкофильтрация компонентов крови, однако уровень лейкоцитов 1×10^6 и менее, до-стигнутый в результате этой процедуры, не полностью предотвращает образование анти-HLA антител у пациен-

тов. [4-6]. Установлено несколько факторов, влияющих на развитие аллоиммунизации: количество лейкоцитов в компоненте крови, количество трансфузий в анамнезе, наличие беременностей у женщин [7-9]. Тем не менее, индивидуальное прогнозирование риска возникновения аллоантител до настоящего времени остается нерешен-ной проблемой [10-12]. В связи с этим представляется актуальным изучить взаимосвязь HLA-генотипа с веро-яностью аллоиммунизации реципиентов в результате интенсивной ге-мокомпонентной терапии.

Цель исследования – оценить генетическую предрасположенность реципиентов к развитию HLA-аллоиммунизации.

Материал и методы. Иммуногематологические и генетические исследования выполнены у 61 пациента (22 мужчины и 39 женщин), получивших в течение предшествующего лечения от 4 до 32 трансфузий компонентов крови (медиана – 11) в гематологической клинике института в 2019-2021 гг. Все компоненты крови были лейкоредуцированы в процессе заготовки. Возраст пациентов от 3 до 78 лет (медиана – 48 лет). Острый лейкоз (ОЛ) диагностирован у 34 больных, миелодиспластический синдром (МДС) – у 10, апластическая анемия (АА) – у 8, лимфома Ходжкина (ЛХ) – у 3, хронический миелолейкоз (ХМЛ) – у 2, саркома – у 2, неходжкинская лимфома (НХЛ) – у 1, множественная миелома (ММ) – у 1 больного. Исследование антилимфоцитарных антител проводили в стандартном микролимфоцитотоксическом тесте. Типирование генов HLA локусов DRB1, DQA1, DQB1 выполняли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием оборудования и реактивов ООО «ДНК-технология» (Россия).

Информированное согласие пациентов на обследование и лечение получено. Материалы исследования одобрены локальным этическим комитетом при ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Статистический анализ осуществляли с помощью критерия хи-квадрат. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. На основании результатов исследования антилимфоцитарных антител, пациенты, которым проводилась интенсивная гемокомпонентная терапия, разделены на две группы: HLA-неиммунизированные ($n=31$) и HLA-иммунизированные ($n=30$). Широта спектра реагирования антител у 3 из 30 аллоиммунизированных пациентов составила 25-49%, у 12 – 50-74%, у 15 – 75-100%. Медицинские и демографические характеристики пациентов представлены в табл.1. Группы больных сопоставимы по возрасту (медиана 49 и 45 лет, соответственно). Женщины составили 48,4% в группе HLA-неиммунизированных и 73,3% им-

мунизированных. Количество беременностей у женщин в первой группе – от 0 до 8 (медиана – 4), родов от 0 до 4 (медиана – 1,5), во второй группе – число беременностей от 0 до 7 (медиана – 2,5), родов – от 0 до 6 (медиана – 2). У 83,9% неиммунизированных больных поставлен диагноз острый лейкоз. В группе аллоиммунизированных пациентов острый лейкоз диагностирован у 26,7%, апластическая анемия – у 23,3%, миелодиспластический синдром – у 33,3% больных.

В результате иммуногенетического обследования реципиентов установлено, что в генотипах аллоиммунизированных больных достоверно чаще, чем в генотипах неиммунизированных, встречались HLA аллели DRB1*04, DQA1*03:01, DQA1*05:01; реже – DRB1*16, DQA1*01:02, DQB1*05:02 (табл. 2).

У HLA-иммунизированных больных достоверно чаще, чем у не- иммунизированных, встречался трехлокусный гаплотип DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02; реже – DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02 (табл. 3).

Обсуждение. Аллоиммунизация к антигенам клеток крови существенно осложняет проведение гемокомпонентной терапии. Наличие антител к антигенам тромбоцитов не позволяет достигнуть адекватного прироста числа тромбоцитов после переливания, что делает необходимым проведение дополнительных трансфузий и несет опасность развития фатального кровотечения у реципиента. Известно, что при относительно равных клинических факторах только часть пациентов отвечает образованием антител на введение чужеродных антигенов – реципиенты-респондеры. Выявление «респондерной» до начала проведения интенсивной гемокомпонентной терапии позволяет службе крови предоставлять фенотипически совместимые компоненты крови и предотвращать иммунизацию. Целью настоящего исследования было определить взаимосвязь между аллелями HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 и HLA-аллоиммунизацией у пациентов гематологической клиники.

В результате иммуногенетического обследования 61 пациента с заболеваниями системы крови, получавших интенсивную гемокомпонентную терапию, было установлено, что помимо гендерных (женский пол) и медицинских факторов (апластическая анемия и ми-

Таблица 1

Демографические и медицинские характеристики пациентов, получавших интенсивную гемокомпонентную терапию

Характеристика пациентов		Количество пациентов, абс. (%)	
		HLA-неиммунизированные, $n=31$	HLA-иммунизированные, $n=30$
Пол:	Женщины	15 (48,4%)	22 (73,3%)
	Мужчины	16 (51,6%)	8 (26,7%)
Возраст, годы	Медиана (интервал)	49 (3-78)	45 (7-71)
Число беременностей	Медиана (интервал)	4 (0-8)	2,5 (0-7)
Число родов	Медиана (интервал)	1,5 (0-4)	2 (0-6)
Диагноз:	ОЛ	26 (83,9%)	8 (26,7%)
	МДС	0	10 (33,3%)
	АА	1 (3,2%)	7 (23,3%)
	ЛХ	0	3 (10,0%)
	ХМЛ	1 (3,2%)	1 (3,3%)
	Саркома	1 (3,2%)	1 (3,3%)
	НХЛ	1 (3,2%)	0
	ММ	1 (3,2%)	0

Частота встречаемости аллелей локусов HLA- DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 у HLA-аллоиммунизированных и HLA-неиммунизированных пациентов

Локус	Аллель	Частота встречаемости HLA аллелей				p
		Неиммунизированные больные, n=31		Аллоиммунизированные больные, n=30		
		абс.	%	абс.	%	
HLA-DRB1	DRB1*01	13	41,9	9	30,0	0,48
	DRB1*03	2	6,5	8	26,7	0,07
	DRB1*04	2	6,5	10	33,3	0,02
	DRB1*07	10	32,3	6	20,0	0,42
	DRB1*08	0	0,0	2	6,7	0,46
	DRB1*09	2	6,5	1	3,3	0,97
	DRB1*11	4	12,9	4	13,3	0,74
	DRB1*12	0	0,0	2	6,7	0,56
	DRB1*13	4	12,9	8	26,7	0,30
	DRB1*14	2	6,5	1	3,3	0,97
	DRB1*15	17	54,8	9	30,0	0,07
	DRB1*16	6	19,4	0	0,0	0,03
	HLA-DQA1	DQA1*01:01	16	51,6	10	33,3
DQA1*01:02		24	77,4	9	30,0	0,00
DQA1*01:03		3	9,7	7	23,3	0,27
DQA1*02:01		10	32,3	6	20,0	0,42
DQA1*03:01		3	9,7	11	36,7	0,03
DQA1*04:01		0	0,0	2	6,7	0,45
DQA1*05:01		6	19,4	15	50,0	0,02
HLA-DQB1	DQB1*02:01	7	22,6	14	46,7	0,08
	DQB1*03:01	3	9,7	7	23,3	0,27
	DQB1*03:02	3	9,7	9	30,0	0,09
	DQB1*03:03	7	22,6	1	3,3	0,06
	DQB1*04:02	0	0,0	2	6,7	0,45
	DQB1*05:01	15	48,4	10	33,3	0,35
	DQB1*05:02	8	25,8	1	3,3	0,03
	DQB1*05:03	1	3,2	1	3,3	0,48
	DQB1*06:02-8	18	58,1	14	46,7	0,53

Примечание. Здесь и в табл. 3: жирным шрифтом выделены значения $p < 0,05$.

елодиспластический синдром) имеются генетические причины, предрасполагающие к выработке анти-HLA антител – наличие в генотипах пациентов HLA-аллелей DRB1*04, DQA1*03:01, DQA1*05:01 и гаплотипа DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02.

Несмотря на растущее количество данных, подтверждающих взаимосвязь между аллоиммунизацией и генотипом системы HLA, точный механизм, лежащий в основе ассоциации между HLA-аллелями и образованием антител против множественных аллоантигенов, неизвестен. Некоторые авторы предполагают, что предрасположенность к аллоиммунизации связана с более эффективной презентацией аллоантигенов, другие исследователи считают, что определенные HLA-аллели являются лишь индикаторами генетического контроля организма над активностью

иммунной системы, в частности над гуморальным иммунным ответом.

Выводы:

1. Установлена генетически обусловленная предрасположенность к развитию HLA-аллоиммунизации, ассоциированная с наличием в генотипах реципиентов HLA-аллелей DRB1*04, DQA1*03:01, DQA1*05:01 и трехлокусного гаплотипа DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02. Риск образования антилимфоцитарных антител снижен у пациентов с HLA аллелями DRB1*16, DQA1*01:02, DQB1*05:02 и HLA-гаплотипом DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02.

2. Факторами риска развития HLA-аллоиммунизации в процессе гемокомпонентной терапии являются: женский пол, апластическая анемия, миелодиспластический синдром.

Частота встречаемости гаплотипов HLA-DRB1-DQA1-DQB1 у HLA-аллоиммунизированных и HLA-неаллоиммунизированных пациентов

Гаплотипы HLA-DRB1-DQA1-DQB1	Частота встречаемости HLA гаплотипов				p
	Неиммунизированные больные, n=31		Аллоиммунизированные больные, n=30		
	абс.	%	абс.	%	
DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02-8	14	45,2	7	23,3	0,12
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05:01	12	38,7	9	30,0	0,65
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01	2	6,5	8	26,7	0,07
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02	1	3,2	9	30,0	0,01
DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:01	4	12,9	6	20,0	0,69
DRB1*13-DQA1*01:03-DQB1*06:02-8	3	9,7	7	23,3	0,27
DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05:02	6	19,4	0	0,0	0,03
DRB1*11-DQA1*05:01-DQB1*03:01	3	9,7	4	13,3	0,96

ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 7-11 см. REFERENCES)

- Минеева Н.В., Кробинец И.И., Блинов М.Н., Капустин С.И. Антигены и антитела к тромбоцитам (обзор литературы). *Онкогематология*. 2013; 8(3): 60-8.
- Бутина Е. В., Шерстнев Ф. С., Максимов О. Д., Зайцева Г. А., Попонина Е. А., Йовдий А. В. и др. Технические и организационные аспекты профилактики HLA-аллоиммунизации и рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов у гематологических больных. *Трансфузиология*. 2018; 19(4): 59-66.
- Чечеткин А.В., Бессмельцев С.С., Киселева Е.А., Касьянов А.Д., Данильченко В.В. Качество тромбоцитных концентратов и эритроцитной взвеси, полученных методом афереза, при сочетанном донорстве. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2019; 20(1): 156-65.
- Эйхлер О.В., Чечеткин А.В., Аджигитова Е.В., Данильченко В.В., Минеева Н.В., Кробинец И.И. и др. Характеристика реакций и осложнений, возникших в связи с трансфузией донорской крови и ее компонентов, в медицинских организациях Российской Федерации в 2019 году. *Трансфузиология*. 2020; 21(4): 304-12.
- Рахмани А.Ф., Михайлова Е.А., Дубинкин И.В., Калмыкова О.С., Галузьяк В.С., Троицкая В.В. и др. Рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов у больных апластической анемией и гемобластозами. *Онкогематология*. 2018; 13(2): 62-72.
- Butina E.V., Sherstnev F.S., Maksimov O.D., Zaytseva G.A., Poponina E.A., Yovdiy A.V. et al. Technical and organizational aspects of prophylaxis of HLA-alloimmunization and platelet refractoriness in hematological patients. *Transfuziologiya*. 2018; 19(4): 59-66. (in Russian)
- Chechetkin A.V., Bessmeltsev S.S., Kiseleva E.A., Kasyanov A.D., Danilchenko V.V. The quality of platelet concentrates and erythrocyte suspension obtained by apheresis method with a multicomponent donation. *Medline.ru. Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal*. 2019; 20(1): 156-65. (in Russian)
- Eihler O.V., Chechetkin A.V., Ajigitova E.V., Danilchenko V.V., Mineeva N.V., Krobinec I.I. et al. Characteristics of transfusion reactions and complications in medical organizations of the Russian Federation in 2019. *Transfuziologiya*. 2020; 21(4): 304-12. (in Russian)
- Rakhmani A.F., Mikhaylova E.A., Dubinkin I.V., Kalmykova O.S., Galuzyak V.S., Troitskaya V.V. et al. Refractoriness to donor platelets transfusion in patients with aplastic anemia and hemoblastosis. *Onkogematologiya*. 2018; 13(2): 62-72. (in Russian)
- Murphy M., Roberts D., Yazer M. *Practical Transfusion Medicine*. 5th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2017.
- Weinstock C., Schnaidt M. Human Leucocyte Antigen sensitisation and its impact on transfusion practice. *Transfus. Med. Hemother.* 2019; 46(5): 356-69.
- Wang J., Xia W., Deng J., Xu X., Shao Y., Ding H. et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. *Transfus. Med.* 2018; 28(1):40-6.
- Basire A., Picard C. Platelet allo-antibodies identification strategies for preventing and managing platelet refractoriness. *Transfus. Clin. Biol.* 2014;21(4-5):193-206.
- Delbos F., Cesbron A. Characterization of HLA allo-immunization and clinical impact in transfusion and organ transplantation. *Transfus. Clin. Biol.* 2017; 24(3):131-7.

REFERENCES

- Shaz B.H., Hillyer C.D., Reyes G.M. *Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2018.
- Mineeva N.V., Krobinec I.I., Blinov M.N., Kapustin S.I. Platelet antigens and antibodies. Literature review. *Onkogematologiya*. 2013; 8(3): 60-8. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Пименова А.С.¹, Гадуа Н.Т.¹, Борисова О.Ю.¹, Миронов А.Ю.¹, Афанасьев М.С.², Афанасьев С.С.¹

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ТИПОВ СУХИХ ТАМПОНОВ И УСЛОВИЙ ИХ ХРАНЕНИЯ НА ВЫСЕВАЕМОСТЬ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия

*Представлены результаты оценки эффективности высеваемости *C. diphtheriae* при использовании разных видов сухих тампонов в исследованиях, имитирующих различные условия его хранения на преаналитическом этапе лабораторного исследования на дифтерию. Использован типовой токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665. Использован коммерческий сухой, стерильный тампон-зонд из хлопка (Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., LTD, Китай), коммерческий сухой, стерильный зонд-тампон (пластик и вискоза) (COPAN, Италия), тупферы с ворсистым зонд-тампоном на аппликаторе из полистирола, стандартный (DELTALAB, S.L., Испания). Произведено пулирование тампонов 24-часовой бактериальной культурой *C. diphtheriae*, далее произведён сразу высев на КТА и КБА. Условия хранения имитировали в течение 3 часов: при комнатных условиях $+ (20-25)^\circ\text{C}$, в холодильнике $+ (4-8)^\circ\text{C}$, в термостате $+ (37\pm 1)^\circ\text{C}$. Оптимально хранение *C. diphtheriae* на всех трёх видах сухих тампонов при $+ (4-8)^\circ\text{C}$; при $+ (20-25)^\circ\text{C}$ – рост наблюдается при высеве с ватного тампона; в тупфере с ворсистым зонд-тампоном отмечено снижение высеваемости *C. diphtheriae*; при использовании вискозного тампона – значительная потеря *C. diphtheriae*. При $+ (37\pm 1)^\circ\text{C}$ отмечено значительное снижение высеваемости *C. diphtheriae* на всех трёх видах тампонов, вплоть до отсутствия роста при использовании вискозного тампона. Для исключения потери *C. diphtheriae* необходимо соблюдать условия взятия и хранения биологического материала на преаналитическом этапе лабораторного исследования, что повысит качество проведения лабораторных микробиологических исследований на дифтерийную инфекцию.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; тампоны; бактериологическая диагностика; условия хранения; биологический материал.

Для цитирования: Пименова А.С., Гадуа Н.Т., Борисова О.Ю., Миронов А.Ю., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С. Влияние разных типов сухих тампонов и условий их хранения на высеваемость *Corynebacterium diphtheriae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (5): 296-300. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-296-300>

Для корреспонденции: Борисова Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. диагностики дифтерийной и коклюшной инфекции; e-mail: olgborisova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Поступила 12.02.2022

Принята к печати 12.03.2022

Опубликовано 21.05.2022

Pimenova A.S.¹, Gadua N.T.¹, Borisova O.Yu.¹, Mironov A.Yu.¹, Afanasiev M.S.², Afanasiev S.S.¹

EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF DRY SWABS AND THEIR STORAGE CONDITIONS ON THE INOCULATION OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 119991, Moscow, Russian Federation

*The results of evaluating the effectiveness of *C. diphtheriae* inoculation using different types of dry swabs in studies simulating various conditions of its storage at the preanalytical stage of a laboratory study for diphtheria are presented. A typical toxigenic strain of *C. diphtheriae* biovar *gravis* No. 665 was used. A commercial dry, sterile cotton swab probe (Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., LTD, China), a commercial dry, sterile swab probe (plastic and viscose) (COPAN, Italy), tufters with a fluffy probe-tampon on a polystyrene applicator; standard (DELTALAB, SL, Spain). The tampons were pooled with a 24-hour bacterial culture of *C. diphtheriae*, then immediately seeded on Tellurite-containing blood agar and *Corynebacterium*. Storage conditions were simulated for 3 hours: at room conditions $+ (20-25)^\circ\text{C}$, in the refrigerator $+ (4-8)^\circ\text{C}$, in a thermostat $+ (37\pm 1)^\circ\text{C}$. Optimal storage of *C. diphtheriae* on all three types of dry swabs at $+ (4-8)^\circ\text{C}$; at $+ (20-25)^\circ\text{C}$ – growth is observed when seeding from a cotton swab; in a swab with a fleecy probe-tampon, a decrease in the inoculation of *C. diphtheriae* was noted; when using a viscose swab – a significant loss of *C. diphtheriae*. At $+ (37\pm 1)^\circ\text{C}$, a significant decrease in the inoculation of *C. diphtheriae* on all three types of tampons was noted, up to the absence of growth when using a viscose tampon. To exclude the loss of *C. diphtheriae*, it is necessary to observe the conditions for taking and storing biological material at the preanalytical stage of a laboratory study, which will improve the quality of laboratory microbiological studies for diphtheria infection.*

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; swabs; bacteriological diagnosis; storage conditions; biological material.

For citation: Pimenova A.S., Gadua N.T., Borisova O.Yu., Mironov A.Yu., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S. Effect of different types of dry swabs and their storage conditions on the inoculation of *Corynebacterium diphtheriae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 296-300 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-296-300

For correspondence: Borisova O.Yu., doctor of medicine (MD), professor, head of laboratory of diagnostics of diphtheria and pertussis infections; e-mail: olgborisova@mail.ru

Information about authors:

Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Borisova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Afanasiev M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>;
Afanasiev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>.

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

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Received 12.02.2022

Accepted 12.03.2022

Published 21.05.2022

Введение. В течение последних четырёх лет заболеваемость дифтерией на территории РФ остаётся на спорадическом уровне. Согласно данным государственной статистической отчётности, в 2018 г. зарегистрировано 4 случая заболевания и 3 случая бактерионосительства, в 2019 г. – 5 случаев заболевания и 2 случая бактерионосительства, в 2020 г. – 1 случай заболевания, в 2021 г. – 4 случая заболевания и 2 случая бактерионосительства [1-3]. Несмотря на благополучную эпидемиологическую обстановку по дифтерийной инфекции, необходимо поддерживать качество проведения лабораторных исследований на эту инфекцию на высоком уровне.

Важнейшим этапом любого лабораторного исследования, от которого зависит его эффективность, является преаналитический этап – взятие и доставка биологического материала. Правильность осуществления этого этапа определяет 80% эффективности последующего лабораторного исследования и своевременность выдачи окончательного ответа, и, тем самым, правильность установления диагноза [4]. Согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных заболеваний» (раздел XXXVIII «Профилактика дифтерии») и методическим указаниям МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции», основным методом лабораторной диагностики дифтерийной инфекции является бактериологический, при котором взятие биологического материала осуществляется двумя сухими стерильными тампонами, которые должны быть доставлены в бактериологическую лабораторию в течение 3 часов. При невозможности выполнения этих условий допускается использование «чашечного» метода (посев на плотные питательные среды, который осуществляется сразу после взятия материала) или жидких транспортных сред, приготовленных в лабораторных условиях, с последующим термостатированием и доставкой в лабораторию на следующий день. Нарушение правил взятия и транспортирования биологического материала может привести к невозможности получения соответствующего образца биоматериала от больного и, следовательно, отсутствию лабораторного подтверждения диагноза.

Лабораторно-приготовленные ватные тампоны давно широко используются для взятия биоматериала из носа и зева на дифтерию. С 1990-х годов для взятия биоматериала из носа и зева на дифтерию стали приме-

няться коммерческие ватные тампоны и с 2000-х годов в практическом использовании появились вискозные и ворсистые тампоны. Проведённый анализ качества бактериологической диагностики дифтерийной инфекции на территории России показал, что на преаналитическом этапе взятия и транспортировки биоматериала допускаются нарушения, которые могут приводить к потере биологического материала и отсутствию высеваемости возбудителя дифтерии на средах первичного посева [5]. Учитывая возможность различных условий хранения биологического материала в медицинских организациях, представляется целесообразным оценить вероятность потери биологического материала, взятого для исследования на дифтерию, при различных условиях его хранения до момента доставки в лабораторию с учётом использования разных сухих тампонов.

Цель работы – оценить эффективность высеваемости возбудителя дифтерии при использовании различных видов сухих тампонов в лабораторных исследованиях, имитирующих различные условия его хранения на преаналитическом этапе.

Материал и методы. Использован типовой токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis* № 665, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК».

Бактериальную культуру *C. diphtheriae* выращивали на кровяном теллуриновом агаре (КТА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7% крови крупного рогатого скота (ЛейТран, Москва) и 0,02% теллурида калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре $(37 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 24 и 48 часов.

Использован коммерческий сухой, стерильный, одноразовый тампон-зонд из хлопка (Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., LTD, Китай), коммерческий одноразовый сухой, стерильный, зонд-тампон (пластик и вискоза) (COPAN, Италия), тупферы с ворсистым зонд-тампоном на аппликаторе из полистирола, стандартный, с точкой слома 80 мм (DELTA LAB, S.L., Испания).

В качестве сред первичного посева использованы КТА и Коринебакагар (КБА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Результаты. Готовили три линейки серийных десятикратных разведений бактериальной культуры типо-

вого токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара gravis № 665 в стерильном физиологическом растворе в соответствии со стандартным образцом 10 ЕД мутности (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ, Москва) – 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 . Все разведения контролировались путём высева по 100 мкл из каждого разведения на три чашки Петри с КТА. Засеянные чашки инкубировали при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч и подсчитывали число выросших колоний (КОЕ/мл) (табл. 1).

Контроль выросших колоний на средах первичного посева из бактериальной суспензии показал, что рост *C. diphtheriae* наблюдается во всех разведениях (5×10^8 - 10^3).

По 100 мкл из каждого разведения пулировали на три вида тампонов: сухой ватный тампон, сухой вязкозный тампон, в тупферы с ворсистым зонд-тампоном, и сразу высевали на две питательные среды первичного посева КТА и КБА, которые используются при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции. Пулирование тампонов производили стерильным наконечником с аэрозольным барьером. Для имитации условий хранения и возможности потери биологического материала производили пулирование по 100 мкл бактериальной взвеси из каждого разведения на ватный тампон, вязкозный тампон, в тупферы с ворсистым зонд-тампоном, затем имитировали следующие условия: 1) хранение в течение 3 ч при комнатных условиях $(20-25)^\circ\text{C}$; 2) хранение в течение 3 ч в холодильнике $(4-8)^\circ\text{C}$; 3) хранение в течение 3 ч в термостате $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После инкубации все тампоны засеивали на среды КТА и КБА. Результаты учитывали через 24 и 48 ч роста (табл. 2).

При высеве сразу после пулирования удалось получить максимальный рост колоний со всех трёх видов тампонов: с ватного тампона рост отмечался из разведения 10^3 - 5×10^3 КОЕ/мл, вязкозного тампона – из разведения 5×10^6 КОЕ/мл, с тупфера с ворсистым зонд-тампоном – из разведения 5×10^3 КОЕ/мл.

При имитации условий хранения в течение 3 ч биологического материала на сухом ватном тампоне получены следующие результаты: при хранении в условиях холодильника при $(4-8)^\circ\text{C}$ удалось получить рост колоний из разведения 10^3 КОЕ/мл, при $(20-25)^\circ\text{C}$ рост колоний отмечен только из разведения 5×10^3 КОЕ/мл, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ – из разведения 5×10^5 КОЕ/мл. При имитации условий хранения биологического материала на сухом вязкозном тампоне получены следующие резуль-

таты: в условиях холодильника при $(4-8)^\circ\text{C}$ удалось получить рост колоний из разведения 5×10^7 КОЕ/мл, при $(20-25)^\circ\text{C}$ рост колоний получен только из разведения 5×10^8 КОЕ/мл, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ наблюдалось отсутствие роста, т. е. полная потеря биологического материала. При имитации условий хранения в тупфере с ворсистым зонд-тампоном оказалось, что при $(4-8)^\circ\text{C}$ удалось получить рост единичных колоний из разведения с 5×10^4 КОЕ/мл, в то время как при $(20-25)^\circ\text{C}$ рост колоний получен из разведения 5×10^6 КОЕ/мл, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ – из разведения 5×10^6 КОЕ/мл.

Обсуждение. При имитации разных условий хранения оказалось, что оптимально хранение возбудителя дифтерии в течение 3 ч на всех трёх видах сухих тампонов в условиях холодильника при $(4-8)^\circ\text{C}$; при комнатных условиях $(20-25)^\circ\text{C}$ – рост наблюдался при высеве с ватного тампона; в тупфере с ворсистым зонд-тампоном отмечено снижение высеваемости возбудителя и при использовании вязкозного тампона – значительная его потеря. Помещение всех трёх видов сухих тампонов в термостат при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ вело к значительному снижению высеваемости возбудителя дифтерии, вплоть до отсутствия его роста при использовании вязкозного тампона. Снижение высеваемости возбудителя дифтерии при помещении сухих тампонов в термостат объясняется, по-видимому, быстрым высыханием тампонов, что приводит к его потере. В процессе пулирования тампонов отмечено, что ватный тампон впитывал бактериальную взвесь *C. diphtheriae* в течение 6 с, ворсистый зонд-тампон – в течение 10 с, вязкозный тампон – в течение 6 минут. Можно предположить, что снижение высеваемости *C. diphtheriae* на вязкозном тампоне может быть связано с плохой впитываемостью бактериальной взвеси возбудителя дифтерии на данном виде тампона. Исследование подтверждает тот факт, что для сохранения высеваемости возбудителя дифтерии доставка биологического материала для исследования на дифтерийную инфекцию на сухих тампонах в бактериологическую лабораторию не должна превышать 3 часов. Полученные результаты послужили обоснованием правил хранения биологического материала на сухих тампонах в медицинских организациях до его доставки в лабораторию, которые вошли в новый нормативный методический документ «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Таблица 1

Приготовление разведений и учёт КОЕ/мл

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси	Среднее количество КОЕ в 1 мл			
		КТА		КБА	
		24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
-1	5×10^8	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост
-2	5×10^7	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост
-3	5×10^6	гст / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост
-4	5×10^5	$1,60 \times 10^3$	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост
-5	5×10^4	$7,20 \times 10^2$	$8,28 \times 10^2$	$3,50 \times 10^2$	$5,20 \times 10^2$
-6	5×10^3	$1,14 \times 10^2$	$1,29 \times 10^2$	$1,26 \times 10^2$	$2,55 \times 10^2$
-7	10^3	13,66	13,66	6	8

Примечание. спл / рост – сплошной рост, гст / рост – густой рост, мнж / рост – множественный рост.

Высев бактериальной суспензии на КТА и КБА с различных видов тампонов

Посев с тампона сразу после его заражения												
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ/тампон											
	ватный тампон				вискозный тампон				ворсистый зонд-тампон			
	КТА		КБА		КТА		КБА		КТА		КБА	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч						
5×10^8	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост								
5×10^7	спл / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост							
5×10^6	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	гст / рост	$2,00 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$2,92 \times 10^3$	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост
5×10^5	$2,40 \times 10^2$	$2,82 \times 10^2$	мнж / рост	мнж / рост	0	0	0	0	$1,24 \times 10^2$	$1,32 \times 10^2$	82	$1,27 \times 10^2$
5×10^4	$9,2 \times 10^1$	$1,20 \times 10^1$	66	76	0	0	0	0	32	33	15	19
5×10^3	23	24	19	19	0	0	0	0	13	14	5	7
10^3	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Посев с тампона через 3 ч после его заражения / условия хранения + (4 – 8) °С												
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон											
	ватный тампон				вискозный тампон				ворсистый зонд-тампон			
	КТА		КБА		КТА		КБА		КТА		КБА	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч						
5×10^8	спл / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост							
5×10^7	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост	$3,60 \times 10^2$	$3,60 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$	$6,00 \times 10^2$	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост
5×10^6	гст / рост	гст / рост	мнж / рост	мнж / рост	0	0	0	0	$2,84 \times 10^2$	$3,07 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$	$1,52 \times 10^2$
5×10^5	$1,60 \times 10^3$	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	0	0	0	0	33	40	13	18
5×10^4	$3,76 \times 10^2$	$4,68 \times 10^2$	$1,81 \times 10^2$	$2,04 \times 10^2$	0	0	0	0	1	1	0	1
5×10^3	23	25	9	12	0	0	0	0	0	0	0	0
10^3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Посев с тампона через 3 ч после его заражения / условия хранения + (20 – 25) °С												
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон											
	ватный тампон				вискозный тампон				ворсистый зонд-тампон			
	КТА		КБА		КТА		КБА		КТА		КБА	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч						
5×10^8	спл / рост	гст / рост	гст / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост					
5×10^7	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост	0	0	0	0	гст / рост	гст / рост	гст / рост	гст / рост
5×10^6	гст / рост	гст / рост	мнж / рост	мнж / рост	0	0	0	0	10	34	17	84
5×10^5	33	36	9	11	0	0	0	0	0	0	0	0
5×10^4	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5×10^3	0	0	7	8	0	0	0	0	0	0	0	0
10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Продолжение табл. 2 см. на стр. 300.

MICROBIOLOGY

Посев с тампона через 3 ч после его заражения / условия хранения + (37 ± 1) °С												
Количество м.к. в 1 мл взвеси	КОЕ / тампон											
	ватный тампон				вискозный тампон				ворсистый зонд-тампон			
	КТА		КБА		КТА		КБА		КТА		КБА	
	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч	24 ч	48 ч
5×10^8	спл / рост	спл / рост	спл / рост	спл / рост	0	0	0	0	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост	мнж / рост
5×10^7	гст / рост	гст / рост	спл / рост	спл / рост	0	0	0	0	$2,00 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$1,20 \times 10^2$
5×10^6	мнж/рост	мнж/рост	мнж/рост	мнж/рост	0	0	0	0	2	6	4	10
5×10^5	26	26	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0
5×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5×10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Заключение. При имитации всех возможных условий хранения в течение 3 ч оптимальным является хранение биологического материала на ватном тампоне, и несколько хуже в тупфере с ворсистым зонд-тампоном. Применение вискозного тампона при всех трёх условиях хранения ведёт к значительному снижению высеваемости возбудителя дифтерии, вплоть до полной его потери при хранении в условиях термостата. Для исключения потери возбудителя дифтерии на преаналитическом этапе бактериологического исследования необходимо соблюдать условия взятия и хранения биологического материала, что повысит качество проведения лабораторных микробиологических исследований на дифтерийную инфекцию.

ЛИТЕРАТУРА

1. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 19.12.18 г. № 01/16590-2018-27.
2. О заболеваемости дифтерией, и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 10.10.2019 г. № 02/14390-2019-27.
3. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо Роспотребнадзора от 02.12.20 г. № 02/24680-2020-27.
4. Методики клинических лабораторных исследований. Том 3. Меньшиков В.В., ред. М.: ООО «Лабора»; 2009.
5. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Миронов А.Ю. и др. Состояние и проблемы

бактериологической диагностики дифтерийной инфекции в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (11): 717-23.

REFERENCES

1. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rosptrebnadzor dated 19.12.18. No. 01/16590-2018-27. [O zaboлеваemosti difteriej, monitoringe za vozбудitelem i sostoyaniem antitoksicheskogo protivodifterijnogo immuniteta naseleniya Rossii. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 19.12.18 g. № 01/16590-2018-27.] (in Russian)
2. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rosptrebnadzor dated 10.10.19. No. 02/14390-2019-27. [O zaboлеваemosti difteriej, i sostoyanii antitoksicheskogo protivodifterijnogo immuniteta naseleniya Rossii. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 10.10.2019 g. № 02/14390-2019-27.] (in Russian)
3. On the incidence of diphtheria, monitoring causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter of Rosptrebnadzor dated 02.12.20. No. 02/24680-2020-27. [O zaboлеваemosti difteriej, monitoringe za vozбудitelem i sostoyanii antitoksicheskogo protivodifterijnogo immuniteta naseleniya Rossii. Informacionnoe pis'mo Rosptrebnadzora ot 02.12.20 g. № 02/24680-2020-27.] (in Russian)
4. Methods of clinical laboratory research. Volume 3. Menshikov V.V., ed. [Metodiki klinicheskikh laboratornykh issledovaniy. Tom 3. Men'shikov V.V., ed.]. Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
5. Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Afanasiev S.S., Afanasiev M.S., Mironov A. Yu. et al. State and problems of bacteriological diagnosis of diphtheria infection in Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (11): 717-23. (in Russian)

© 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/%	Опухолевая ткань, абс/%	Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%	Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%	Опухолевая ткань, абс/%	Здоровая ткань, абс/%	Опухолевая 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

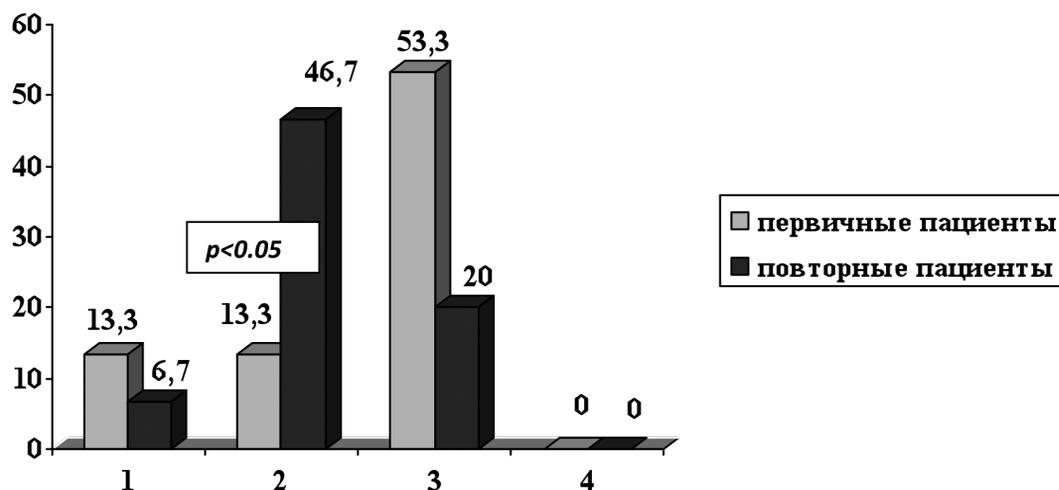


Рис. 1. Частота ассоциаций бактерий (в %) у первичных и повторных пациентов в здоровой ткани.

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.

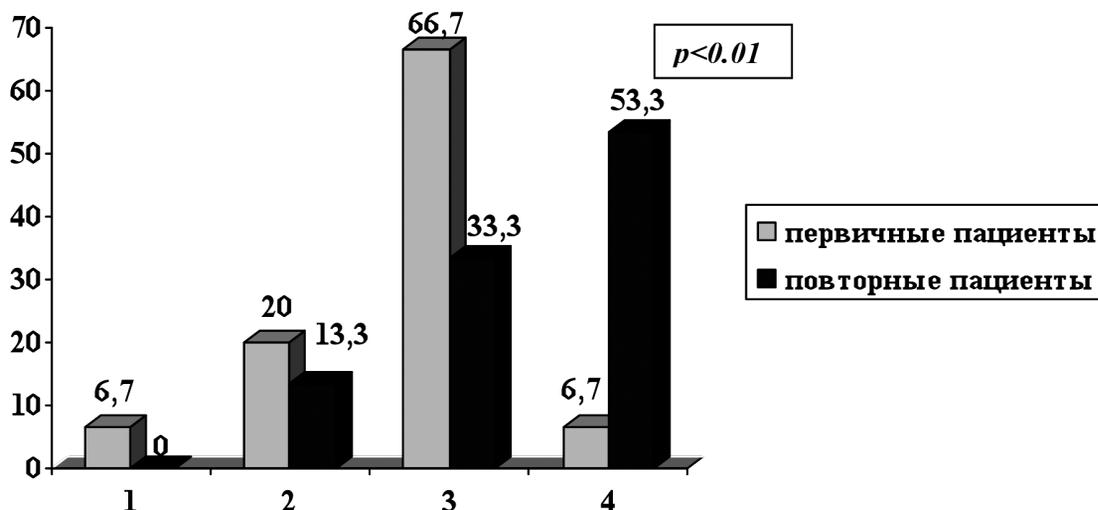


Рис. 2. Частота ассоциаций бактерий (в %) у первичных и повторных пациентов в опухолевой ткани.

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. *Zlokachestvennyye 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.
- Aneesha 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.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Омарова С.М.¹, Алиева А.И.¹, Исаева Р.И.¹, Акаева Ф.С.¹, Миронов А.Ю.^{2,3}, Митрохин С.Д.^{2,4}

ИММУННЫЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ЖЕНЩИН С ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ

¹ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 367000, Махачкала, Россия;

³ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

³ФГБУ Академия постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Россия;

⁴ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 им. Л. А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы, 123423, Москва, Россия

Проникновение в женские половые пути возбудителей инфекции сопряжено с развитием цервицита. В большинстве случаев – это возбудители инфекции, передающиеся половым путём (ИППП). Высокий уровень вирусной и бактериальной нагрузки при исследовании клинического материала от женщин с инфекционно-воспалительной патологией (ИВП) шейки матки влияет на активность реакций врождённого иммунитета. Обследованы 76 пациенток репродуктивного возраста, из них 36 женщин с ИВП шейки матки и 40 женщин группы сравнения. Дисбаланс микробиоценоза может сопровождаться иммунными и микробиологическими нарушениями. Цель исследования – изучить иммунные и микробиологические нарушения у женщин с инфекционно-воспалительной патологией шейки матки. Для достижения цели поставлены задачи: выявить связь между уровнем экспрессии генов TLR₂ и TLR₄ в эпителиальных клетках цервикального канала женщин, в которых определяются УПИМ, определить видовой спектр и этиологическую значимость микробиоты бактериальной биоплёнки слизистой оболочки шейки матки в патогенезе цервицитов у женщин репродуктивного возраста. Установлено, что определение показателей врождённого иммунитета, таких как интерфероны в сыворотке крови и экспрессия рецепторов TLR₂ и TLR₄, с изучением их баланса с учётом провоспалительных и противовоспалительных свойств при ИВП шейки матки имеет важное прогностическое значение. Повышение уровня ответной иммунной реакции в виде гиперстимуляции антигенов возбудителей этой инфекции ведёт к хронизации воспалительного процесса в урогенитальном тракте, рубцеванию тканей, что может играть важную роль в развитии бесплодия и прерывания беременности у женщин репродуктивного возраста.

Ключевые слова: инфекционно-воспалительные заболевания; слизистая оболочка шейки матки; иммунные и микробиологические нарушения.

Для цитирования: Омарова С.М., Алиева А.И., Исаева Р.И., Акаева Ф.С., Миронов А.Ю., Митрохин С.Д. Иммунные и микробиологические нарушения у женщин с инфекционно-воспалительной патологией шейки матки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 309-314. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-309-314>

Для корреспонденции: Алиева А.И., д-р мед. наук, доц., проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: aminamag@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.12.2021

Принята к печати 15.02.2022

Опубликовано 21.05.2022

Omarova S.M.¹, Alieva A.I.¹, Isaeva R.I.¹, Akayeva F.S.¹, Mironov A.Yu.^{3,4}, Mitrokhin S.D.²

IMMUNE AND MICROBIOLOGICAL DISORDERS IN WOMEN WITH INFECTIOUS AND INFLAMMATORY PATHOLOGY OF THE CERVIX

¹Dagestan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 367000, Makhachkala, Russia;

²G. N. Gabrichevskogo Moscow research institute for epidemiologyµbiology, 125212, Moscow, Russia;

³Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies FMBA, 115682, Moscow, Russia;

⁴GBUZ «City clinical hospital № 67», 123423, Moscow, Russia

Penetration into the female genital tract of infectious agents is associated with the cause of the onset of cervicitis. In most cases, these are sexually transmitted diseases (STDs). A high level of viral and bacterial load in the study of clinical material from women with infectious and inflammatory pathology (IVP) of the cervix affects the activity of innate immunity reactions. The total number of examined patients was 76 patients of reproductive age, of which 36 women with cervical IVP and 40 women made up the comparison group. The imbalance of microbiocenosis can be accompanied by immune and microbiological disorders. The aim of the study was to study immune and microbiological disorders in women with infectious and inflammatory pathology of the cervix. To achieve the goal, the following tasks were set: to identify the relationship between the expression level of TLR2 and TLR4 genes in the epithelial cells of the cervical canal of women in which UPM is determined. To determine the species spectrum and etiological significance of the microbiota of bacterial biofilm of the cervical mucosa in the pathogenesis of cervicitis in women of reproductive age. It has been established that the determination of indicators of innate immunity, such as interferons, in blood serum and the expression of TLR2 and TLR4 receptors, with the study of their balance, taking into account the pro-inflammatory and anti-inflammatory properties in IVP of the cervix, has an important prognostic value. An increase in the level of the immune response in the form of hyperstimulation of antigens of IVP pathogens leads to the chronization of the inflammatory process in the urogenital tract, to scarring of tissues, which can play an important role in the development of infertility and termination of pregnancy in women of reproductive age.

Key words: infectious and inflammatory diseases; cervical mucosa; immune and microbiological disorders.

For citation: Omarova S.M., Alieva A.I., Isaeva R.I., Akayeva F.S. Mironov A.Yu. Mitrokhin S.D. Immune and microbiological disorders in women with infectious and inflammatory pathology of the cervix. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 309-314 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-309-314>

For correspondence: Alieva A. I., Doctor of Medical Sciences, professor, of the department of microbiology, virusology and immunology; e-mail: aminamag@mail.ru

Information about authors:

Omarova S.M., <https://orcid.org/0000-0002-4034-0742>;
Alieva A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2665-9981>;
Isaeva R.I., <https://orcid.org/0000-0001-5959-2125>;
Akayeva F.S., <https://orcid.org/0000-0002-1356-1013>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4148-0752>;
Mitrokhin S.D., <https://orcid.org/0000-0001-5127-1060>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.12.2021

Accepted 15.02.2022

Published 21.05.2022

Введение. Заболевания урогенитального тракта в Российской Федерации являются одними из важных причин обращений пациентов на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи населению [1].

Слизистая оболочка шейки матки является барьером между верхним отделом урогенитального тракта женщин и окружающей средой. Она постоянно подвергается воздействию повреждающих факторов. Высоким агрессивным антигенным воздействием на слизистую оболочку шейки матки обладают возбудители инфекций, передаваемых половым путём [2]. Этиологическая структура цервицитов, которые чаще выявляются у женщин репродуктивного возраста (до 70% случаев), постоянно изменяется. В структуре хронических инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ) цервикального канала доминируют цервициты, вызванные *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, вирусами папилломы человека (ВПЧ) и простого герпеса (ВПГ) 2 серотипа [2, 3]. В большинстве случаев ИВЗ урогенитального тракта ведут к нарушению репродуктивной функции. Заболевания репродуктивной системы могут быть вызваны и условно-патогенными микроорганизмами (УПМ).

Дисбаланс микробиоценоза может сопровождаться микробиологическими и иммунными нарушениями, клиническими проявлениями, степень выраженности которых варьирует от бессимптомного течения до тяжёлого воспаления. При неблагоприятных условиях УПМ могут вызывать тяжёлое воспаление слизистой оболочки шейки матки, которое ведёт к ряду осложнений: бесплодию, угрозе прерывания беременности, частым самопроизвольным абортam, патологии плаценты, внутриутробной инфекции (ВУИ) плода [2 – 4].

Первая линия иммунной защиты организма человека – Toll-подобные рецепторы (TLR), т. е. система врождённого иммунитета. TLR способны распознавать консервативные структуры бактерий, вирусов, грибов, простейших, вещества, образующиеся при повреждении клеток организма хозяина. TLR усиливают локальный синтез цитокинов, простагландинов, хемокинов, антимикробных пептидов, включают механизм воспалительного иммунного ответа. Иницирование TLRs ведёт к продукции эффекторных факторов эпителиальными клетками: провоспалительных цитокинов, антимикробных пептидов, молекул адгезии, белков острой фазы и

др. Эпителиоциты влажной части шейки матки и эндоцервикса экспрессируют все типы TLR. Экспрессия TLR₂ и TLR₄ меньше в нижних отделах женских половых путей по сравнению с верхними отделами. Выраженность иммунного ответа в нижних отделах женских половых путей снижена вследствие наличия нормальной микробиоты, в то время как в верхних отделах женских половых путей при проникновении микроорганизмов могут развиваться более выраженные иммунные реакции [4 – 8].

Воспалительные заболевания половых органов характеризуются рядом отличительных признаков: ростом удельного веса УПМ, развитием антибиотикорезистентности микроорганизмов, изменением клинической картины. Часто встречающиеся в последнее время стёртые формы, бессимптомное или атипичное течение урогенитальных микробных воспалений обусловлено комплексом факторов, среди которых, по мнению специалистов основными могут являться когнитивные явления, нарушения микроциркуляции и иннервации гениталий, инфекционные агенты, нарушение местного и системного иммунитета [10].

В последнее время выросло количество микоплазменной, хламидийной, вирусной и смешанной инфекции, борьба с которой представляет значительную проблему по причине развивающейся резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП) и особенностями ответных иммунных реакций организма. При исследовании микроскопическим методом биоматериала из влажной и отделяемого шейки матки у пациенток выявляется смешанная микробиота с преобладанием *Staphylococcus* spp. и грибов рода *Candida* spp., что может являться причиной воспалительного процесса в шейке матки [11].

Грибы рода *Candida* spp., составляющие нормальную микробиоту слизистой оболочки половых органов у женщин, выделяются в 10-30% случаев из влажной здоровых небеременных женщин. В составе полимикробных ассоциаций УПМ, грибы *Candida* spp. обнаруживаются в 30% случаев у женщин, обратившихся к гинекологу с жалобами на выделения из влажной [12].

Распространение хронических инфекционно-воспалительных заболеваний у женщин фертильного возраста, снижение неспецифической резистентности в значительной степени ведут к длительной персистенции микробных патогенов в организме женщин и к росту

частоты внутриутробных инфекций [13, 14]. Передаваемые половым путём, ИВЗ органов малого таза, и инфекционные осложнения приводят к хронизации процесса с изменениями клеток, в том числе, и малигнизацией. Подобные процессы индуцируют инфекционные агенты, особенно ВПЧ.

В акушерской и гинекологической практике наблюдается определённое увеличение заболеваемости инфекциями и дисбиотическими нарушениями с ростом частоты встречаемости полирезистентных к АМП микроорганизмов. Аспектуальная структура микробиоты влагалища и шейки матки насчитывает более 300 различных видов микроорганизмов, многие из которых некультивируемые. Культуральным методом удаётся изолировать не более 1% всех микроорганизмов микробиоценоза влагалища и шейки матки. При этом не учитываются многие особенности взаимоотношений и многообразия микроорганизмов у женщин с гинекологическими заболеваниями, в частности ИВЗ шейки матки [15, 16].

Продолительно существующая проблема диагностики ИВЗ органов малого таза диктует необходимость установления этиологического агента воспаления, что позволяет подобрать этиотропное лечение с учётом антибиотикограммы выявленного инфекционного патогена.

Методы детекции микроорганизмов, методы регистрации сопутствующих осложнений не всегда учитываются в современных рекомендациях, в которых регламентируют перечень и алгоритм лабораторных исследований, что приводит к ложноотрицательным результатам.

Подавляющее большинство проведённых исследований дают полное основание для использования иммунологических методов для выявления группы пациенток с невыясненной этиологией гинекологических заболеваний, нуждающихся в углублённом многократном развёрнутом исследовании. Предложенное иммунологическое обследование увеличивает шансы успешной диагностики [17 – 19].

Цель исследования – изучить иммунные и микробиологические нарушения у женщин с ИВЗ шейки матки.

Материал и методы. В исследование включены 76 женщин репродуктивного возраста, обратившихся по поводу бесплодия и различных жалоб воспалительного характера. 1-ю группу составили 36 женщин с ИВЗ шейки матки и 40 женщин составили группу сравнения. Диагноз ИВЗ шейки матки смешанной этиологии подтверждён с учётом положительных результатов лабораторной диагностики с применением культурального метода – посев клинического материала осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ «Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии» WHO, 1994; определение чувствительности выделенных УПП к АМП, определяли диско-диффузионным методом в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04.

ДНК возбудителя выделяли с помощью сертифицированных коммерческих наборов «ДНК-сорб-А-М», «ДНК-сорб-В», «ДНК-сорб-С». Для ПЦР использованы коммерческие наборы ООО НПФ «Гентех» и ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора с учётом рекомендаций и инструкций фирмы-производителя (Москва).

Иммунные реакции в сыворотке крови у пациенток с ИВП шейки матки анализировали с помощью специ-

альных иммуноферментных и биохимических методов: уровень γ -интерферона с применением тест-системы γ -Интерферон-ИФА-БЕСТ; уровень интерлейкина-1 β ; интерлейкина 4 и 6 – с применением тест-систем «Pro-Con ИЛ-1 β », «Pro-Con ИЛ-4», «Pro-Con ИЛ-6», (Санкт-Петербург); показатели циркулирующих иммунных комплексов и лактоферина – с применением тест-систем «Лактоферрин-стрип D-4106» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Клинический материал брали при помощи цервикальных цитощёток «Юнона» (фирма «Симург», Беларусь). Из полученного клинического материала выделяли общую РНК методом кислородной экстракции. Проводили реакцию обратной транскрипции кДНК генов TLR_2 и TLR_4 на матрице мРНК с последующим определением количества копий кДНК при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) относительно 10^6 копий β -актина. Оценивали экспрессию генов TLR_2 , TLR_4 . В связи с различным числом наблюдений в каждой из групп для оценки статистической достоверности различий экспрессии генов в исследуемых группах использован непараметрический критерий Манна-Уитни [9].

Результаты и обсуждение. Как правило, при диагностике ИВЗ шейки матки необходим комплексный подход. Он предполагает ряд методов исследования, которые позволяют с точностью установить диагноз и составить наиболее эффективную схему лечения.

Актуальными для диагностики ИВЗ шейки матки являются следующие исследования:

- бактериоскопический (мазок на микробиоту);
- бактериологический (культуральный посев);
- ДНК-диагностика;
- иммунодиагностика.

Из бактерий у обследованных женщин с ИВЗ шейки матки чаще выделяли *Staphylococcus* spp. – 26,9% случаев, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* – в 21,8% случаев, 14,3% приходилось на микробные ассоциации двух и более возбудителей. Бактерии других родов и грибов рода *Candida*, выделены в 2,9% и 4,3% случаев, соответственно.

Высокоинформативной является ДНК-диагностика с использованием ПЦР. ПЦР позволяет обнаружить возбудителя в исследуемом материале, даже при крайне низкой его концентрации. Возбудители ИВЗ шейки матки детектированы методом ПЦР: в 8,2% случаев выявлены *Chlamydia* spp. и *Trichomonas* spp. – в 1,6% случаев, ВПЧ – в 13,5% случаев, *Neisseria gonorrhoeae* – в 1,2% случаев, *Ureaplasma* spp. и *Mycoplasma* spp. – 2,3% и 1,9% случаев, соответственно, ВПГ – 53,7% случаев, цитомегаловирус (ЦМВ) – в 45,6% случаев. ВПГ и ЦМВ играют важную этиологическую роль в развитии микстинфекции у обследованной группы женщин.

В задачи исследования входило выявление связи между уровнем экспрессии генов TLR_2 и TLR_4 в эпителиальных клетках цервикального канала женщин, в которых определяются УПП – *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*.

Проведена детекция ДНК микроорганизмов в урогенитальном тракте методом ПЦР-РВ, которая показала наличие *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и др. При культуральном исследовании у 70% обследованных женщин с ИВЗ шейки матки выявлены возбудители персистирующей инфекции:

Таблица 1

Показатели иммуноглобулинов сыворотки крови в группах обследованных женщин

Иммуноглобулины, мкг/мл	Группа с ИВП (n=36)	Группа сравнения (n=40)
IgG	35,4±17,0	28±12,0
IgA	69,8±30,9	82±41,1
sIgA	163,6±72,8	146±48,1

Примечание. Здесь и в табл. 2,3: n – число обследуемых.

Таблица 2

Показатели иммуноглобулинов вагинального секрета обследованных женщин

Иммуноглобулины, мкг/мл	Группа с хроническим течением ИВЗ (n=20)	Группа с острым течением ИВЗ (n=16)	Группа сравнения (n=40)
IgG	504,1±3,3	1335,2±89,3	87,2±2,6
IgA	152,7±2,0	582,3±16,1	34,9±1,7
sIgA	452,3±23,6	2038,2±75,1	142,1±2,8

Ureaplasma urealyticum и *U. parvum* – 30% случаев; *Mycoplasma hominis* – 20% случаев; *Candida albicans*, *Escherichia coli*, представители родов *Proteus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. – в 20% случаев. У 25% пациенток определена микст-инфекция, вызванная вирус-бактериальной ассоциацией; в 5% случаев выявлены вирусы: ЦМВ, ВПГ 1 и 2 типов, ВПЧ.

Обнаружение ВПГ варьировало от 52,4% до 7,7%, ЦМВ – в 45,6%-19,2% случаев, со значительным увеличением этих показателей в 1-й группе. Хламидии выявлялись от 39,8 до 35,5% случаев. Специфические IgG антитела к ЦМВ суммарно во всех группах выявлены у 79 из 100 женщин (76,6%) с высоким риском реактивации персистирующего вируса или развитием суперинфекции.

ДНК ЦМВ в материале из цервикального канала детектирована в 1-й группе обследованных в 45,6% случаев (47 из 100). Во 2-й группе обследованных ДНК ЦМВ обнаружена у 51 из 100 женщин (49,5%). Практически у всех женщин (97%) отмечается высокая частота вирусных, вирус-бактериальных инфекций и микозов.

Хроническая цитомегаловирусная инфекция (ЦМВИ) чаще всего встречалась в виде микст-инфекции с ВПГ и токсоплазмами (32%), что влияло на развитие персистирующего хронического ИВЗ шейки матки. ЦМВ и ВПГ выявлены в 22,3 и 29,1% случаев, соответственно; ЦМВ и *Chlamydia* spp. в 3,8% случаев; *Trichomonas* spp., *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma* spp. в ассоциации с ЦМВ выявлены от 2,9 до 1,9% случаев, прочие патогены выявлены в 0,9-1,9% случаев.

Среди патогенов выделялись *Chlamydia* spp., как в монокультуре, так и в ассоциации с другими возбудителями ИППП, что вероятно связано с формированием осложнённого урогенитального анамнеза у обследованных женщин. Выявлена тенденция к возрастающей роли различных ассоциаций в развитии ИВЗ шейки матки у женщин в обеих обследованных группах: бактериальных, вирус-бактериальных, вирусных.

Развитие, тяжесть, локализация и распространённость патологического процесса, исход урогенитальной патологии определяется видом возбудителя, его патогенностью. Оценка иммунного статуса имеет важное прогностическое значение, как для постановки диагноза, так и для проведения эффективной терапии.

С целью выявления нарушений иммунного статуса при воспалительном процессе, в том числе и хронической инфекции, у женщин исследован комплекс иммунологических показателей – уровень иммуноглобулинов IgG, IgA, sIgA в сыворотке крови и в вагинальном секрете по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

Установлено, что уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови обследованных женщин с ИВП шейки матки и здоровых женщин не имел существенных различий. Диагностически значимым оказалось исследование уровня IgG, IgA, sIgA в вагинальном секрете у пациенток с ИВЗ шейки матки (табл. 2).

Исследование концентрации IgG, IgA, sIgA показало повышение показателей по сравнению с контрольной группой. Более выраженное увеличение выявлено при остром течении заболевания: IgG (1335,2±89,3) мкг/мл, IgA (582,3±16,1) мкг/мл, sIgA (2038,2±75,1) мкг/мл, что значительно отличалось от показателей в группе с хроническим течением заболевания.

Можно предположить, что инфекционные патогены способны активировать местный иммунный ответ в определённом локальном отделе слизистой оболочки, что ведёт к повышению уровня иммуноглобулинов в вагинальном секрете. При этом, чем выше степень выраженности воспалительного процесса, тем больше выражена местная иммунная реакция.

У женщин с ИВЗ шейки матки изучена экспрессия генов TLRs в эпителиальных клетках цервикального канала (табл. 3).

В группе женщин с хроническим течением заболевания выявлено повышение уровня экспрессии генов TLR₂ и TLR₄, до 47,86±25,7 и 0,40±0,08 (*10⁵ количества копий к ДНК TLR₂ и TLR₄) относительно 10⁶ копий гена β-актина, соответственно, по сравнению с показателями женщин, входящих в группу контроля (TLR₂ – 19,95±11,80 и TLR₄ – 0,06±0,03). В группе с обострением ИВЗ отмечено более выраженное повышение экспрессии генов TLR₂ и TLR₄ до 52,48±16,67 и 1,35±0,43 (*10⁵ количества копий к ДНК TLR₂ и TLR₄) относительно 10⁶ копий гена β-актина, соответственно, по сравнению с уровнем экспрессии TLR₂ и TLR₄ женщин, входящих в группу контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о более высоком количестве TLR₂ (50,12±22,30) (*10⁵ количества копий к ДНК TLR₂) относительно 10⁶ копий гена

Экспрессия генов TLRs в эпителиоцитах цервикального канала у здоровых женщин и в группах с ИВЗ шейки матки

Показатели TLRs, мкг/м	Группа с хроническим течением ИВЗ (n=20)	Группа с острым течением ИВЗ (n=16)	Группа сравнения (n= 40)
TLR ₂	47,86±25,7	52,48±16,67	19,95±11,80
TLR ₄	0,40±0,08	1,35±0,43	0,06±0,03

β-актина по сравнению с TLR₄ (0,87±0,32) (*10⁵ количества копий к ДНК TLR₉) относительно 10⁶ копий гена β-актина в эпителиальных клетках слизистой оболочки цервикального канала у пациенток с ИВЗ шейки матки.

Можно предположить, что чем выше степень выраженности воспалительного процесса, тем больше выражена местная иммунная реакция, связанная с активацией защитных механизмов слизистых оболочек организма. Нормализация показателей мукозального иммунитета соответствовала восстановлению микробиотоза цервикального канала.

Установлено, что в эпителиальных клетках здоровых женщин также экспрессируются TLRs. В группе здоровых женщин в эпителиальных клетках слизистой оболочки цервикального канала уровень экспрессии генов TLR₂ составил – 149,7x10³ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, TLR₄ – 0,8x10³ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина. Экспрессия гена TLR₂ сопоставима с показателями у женщин других исследуемых групп, в то время как показатель TLR₄ достоверно выше на порядок.

В группе сравнения у женщин, у которых обнаружены *U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *C. trachomatis* и др., получены данные по экспрессии рецепторов TLR₂ и TLR₄. Следует отметить, что клинических проявлений инфекционной патологии в этой группе не выявлено. В данной группе женщин уровень экспрессии генов TLR₂ составил – 379,9x10³ копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина, TLR₄ – 0,6x10³ копий исследуемого гена. Можно утверждать о достоверном увеличении показателя TLR₂ в 2,53 раза относительно такового в группе здоровых женщин, у которых возбудители инфекции не выявлены.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой вирусно-бактериальной нагрузке клинического материала от обследованных групп женщин, что, в свою очередь, влияет на активность иммунных реакций врожденного иммунитета, как при острой, так и при хронической урогенитальной инфекции шейки матки, с наличием дисбаланса в продукции интерферонов, как с увеличением провоспалительных видов, так и уровня экспрессии TLRs.

Заключение. Определение показателей врожденного иммунитета, таких как интерфероны в сыворотке крови и экспрессия рецепторов TLR₂ и TLR₄, с изучением их баланса с учётом провоспалительных и противовоспалительных свойств при ИВЗ шейки матки имеет важное прогностическое значение. Повышение уровня ответной иммунной реакции в виде гиперстимуляции антигенами возбудителей данной инфекции ведёт к хроническому течению воспалительного процесса в урогенитальном тракте, рубцеванию тканей, что может играть важную роль в развитии бесплодия и прерывания беременности у женщин репродуктивного возраста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азнабаева Л. М., Жеребятъева О. О., Михайлова Е. А., Киргизова С. Б., Махалова Г. О., Фомина М. В. И др. Иммуноферментная детекция уровня цитокинов для определения динамики течения воспалительного процесса. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 12(21); 3: 195-8.
2. Ковальчук Л. В., Макаров О. В., Ганковская Л. В. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
3. Савельева Г. М., Бреусенко В. Г. Гинекология. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
4. Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Свитич О. А., Мироншиченкова А. М., Ганковский В. А. Роль Toll-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*, 2012; 2: 147-53.
5. Ганковская О. А., Ганковская Л. В., Сомова О. Ю., Зверев В. В. Toll-подобные рецепторы, распознающие лиганды вируса герпеса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 2:108-11.
6. Ганковская О. А., Бахарева И. В., Ганковская Л. В., Сомова О. Ю., Зверев В. В. Исследование экспрессии генов TLR₉, NF-κB, ФНОα в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 2: 61-5.
7. Ганковская О. А., Зверев В. В., Лавров В. Ф., Блинкова Л. П., Ганковская Л. В., Кузнецов П. А. Изменение уровня экспрессии сигнальных рецепторов врожденного иммунитета при инфекции, вызванной *Candida albicans in vitro* и *in vivo*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009; 3: 60-4.
8. Свитич О. А., Омарова С. М., Алиева А. И., Рассказова Н. Д., Зверев В. В., Исследование микрофлоры и врожденного иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных. *Медицинская иммунология*. 2016; 18 (2): 163-70.
9. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998.
10. Жеребятъева О. О., Махалова Г. О., Киргизова С. Б., Кшнясева С. К., Миронов А. Ю., Михайлова Е. А. Мукозальный иммунитет и микрофлора репродуктивного тракта гинекологических больных до и после иммуномодулирующей терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (3):177-80.
11. Морева Ж. Г., Гончаров Д. Б., Миронов А. Ю., Васильев М. М. Смешанная инфекция у пациентки с рецидивирующим вульвовагинальным кандидозом. *Проблемы медицинской микологии*. 2021; 23 (2):116.
12. Морева Ж. Г., Миронов А. Ю., Сащенко В. П., Васильев М. М. Рецидивирующий урогенитальный кандидоз у пациентки с трихомонадным цервицитом. *Успехи медицинской микологии*. 2019; 20: 276-81.
13. Морева Ж. Г., Миронов А. Ю., Гончаров Д. Б., Васильев М. М., Сащенко В. П. Распространённость *Trichomonas vaginalis*, вируса папилломы человека у женщин с заболеваниями репродуктивных органов и наличием *Toxoplasma gondii*. *Проблемы медицинской микологии*. 2020; 22 (3): 107.
14. Караулов А. В., Афанасьев С. С., Затевалов А. М., Несвижский Ю. В., Воропаева Е. А., Афанасьев М. С. И др. Дискриминантный анализ в установлении взаимозависимости патогенетических механизмов развития гестационных осложнений при урогенитальной инфекции беременных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 66 (7): 443-53.

MICROBIOLOGY

15. Радугина Н. В., Миронов А. Ю., Жиленкова О. Г., Селькова Е. П., Затевалов А. М., Мехтиев Э. Р. Сравнительная характеристика состояния микробиоценоза вагинального тракта и его функциональной активности при кандидозной, микоплазменной, ВПЧ-инфекции и бактериальном вагинозе. *Успехи медицинской микологии*. 2018;18: 52-61.
16. Морева Ж. Г., Гончаров Д. Б., Миронов А. Ю., Васильев М. М., Сащенко В. П., Иевлива Е. С. Клинико-лабораторные особенности токсоплазмоза у женщин с гинекологическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (6):375-81.
17. Жеребятьева О. О., Михайлова Е. А., Миронов А. Ю., Махалова Г. О., Киргизова С. Б., Азнабаева Л. М., Махалов В. Ю. Сравнительная характеристика лабораторных методов диагностики урогенитальных воспалительных заболеваний. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(20) (2): 308-10.
18. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. 2-е изд. Воробьев А.А., ред. Москва: Медицинское информационное агентство; 2015.
19. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х томах. Зверев В.В., Бойченко М.Н., ред. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
- infections *in vitro* and *in vivo*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; 3: 60-3. (in Russian)
8. Svitich O. A., Omarova S. M., Alieva A. I., Rasskazova N. D., Zverev V.V. Study of microflora and innate immunity of the mucous membranes of the upper respiratory tract during intrauterine infection of the fetus and neonatal pneumonia. *Meditinskaya immunologiya*. 2016; 18(2): 163-70. (in Russian)
9. Glants C. Medico-biological statistics [MediKo-biologicheskaya statistika]. Moscow: Praktika; 1998.
10. Zherebyat'eva O. O., Makhalova G. O., Kirgizova S. B., Kshnyaseva S. K., Mironov A. Yu., Mikhailova E. A. Mucosal immunity and microflora of the reproductive tract of gynecological patients before and after immunomodulatory therapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(3): 177-80. (in Russian)
11. Moreva Zh. G., Goncharov D. B., Mironov A. Yu., Vasiliev M. M. Mixed infection in a patient with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2021; 23(2): 116. (in Russian)
12. Moreva Zh. G., Mironov A. Yu., Sashchenko V. P., Vasiliev M. M. Recurrent urogenital candidiasis in a patient with trichomonas cervicitis. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2019; 20: 276-81. (in Russian)
13. Moreva Zh. G., Mironov A. Yu., Goncharov D. B., Vasiliev M. M., Sashchenko V. P. Prevalence of *Trichomonas vaginalis*, human papillomavirus in women with diseases of the reproductive organs and the presence of *Toxoplasma gondii*. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2020; 22(3): 107. (in Russian)
14. Karaulov A. V., Afanasiev S. S., Zatevalov A. M., Nesvizhskiy Y. V., Voropaeva E. A., Afanasiev M. S. et al. Discriminant analysis to establish the interdependence of the pathogenetic mechanisms of the development of gestational complications in urogenital infections in pregnant women. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 66(7): 443-53. (in Russian)
15. Radugina N. V., Mironov A. Yu., Zhilenkova O. G., Sel'kova E. P., Zatevalov A.M., Mekhtiev E. R. Comparative characteristics of the state of microbiocenosis of the vaginal tract and its functional activity in candidiasis, mycoplasma, HPV infection and bacterial vaginosis. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2018;18: 52-61. (in Russian)
16. Moreva Zh. G., Goncharov D. B., Mironov A. Yu., Vasil'ev M. M., Sashchenko V. P., Ievliva E. S. Clinical and laboratory features of toxoplasmosis in women with gynecological diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(6): 375-81. (in Russian)
17. Zherebyat'eva O. O., Mikhailova E. A., Mironov A. Yu., Makhalova G. O., Kirgizova S. B., Aznabayeva L. M., Makhalov V. Yu. Comparative characteristics of laboratory methods for the diagnosis of urogenital inflammatory diseases. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2017; 11(20) (2): 308-10. (in Russian)
18. Medical microbiology, virology and immunology. 2nd ed. [Meditinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya]. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2015. (in Russian)
19. Medical microbiology, virology and immunology. In 2 volumes [meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. V 2-kh tomakh]. Zverev V.V., Boychenko M.N., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)

REFERENCES

1. Aznabayeva L. M., Zherebyatyeva S. A., Mikhailova, E. A., Kirgizova S. B., Machalova G. A., Fomina M. V. et al. Immunoassay detection of cytokines to determine the dynamics of the inflammatory process. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2018; 12(21) (3): 195-8. (in Russian)
2. Kovalchuk L. V., Makarov O. V., Gankovskaya L. V. Preterm birth, infection, innate immunity. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
3. Savel'eva G. M., Breusenko V. G. Gynaecology [Ginekologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
4. Koval'chuk L. V., Gankovskaya L. V. Svitich O. A., Mirosnichenkova A. M., Gankovskiy V. A. The role of Toll-like receptors in pathogenesis of infection humon diseases. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e*. 2012; 2: 147-53. (in Russian)
5. Gankovskaya O. A., Gankovskaya L. V., Somova O. Yu., Zverev V. V. Toll-like receptors recognizing ligands of herpesvirus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; 2: 108-11. (in Russian)
6. Gankovskaya O. A., Bakhareva I. V., Gankovskaya L. V., Somova O. Yu., Zverev V. V. Study of expression of TLR₉, NF-kappaB, TNFalpha genes in cells of cervical canal mucosa in pregnant women with herpesvirus infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; 2: 61-4. (in Russian)
7. Gankovskaya O. A., Zverev V. V., Lavrov V. F., Blinkova L. P., Gankovskaya L. V., Kuznetsov P. A. Changes of expression levels of innate immunity signaling receptors during *Candida albicans*

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Бочарова Ю.А.¹, Савинова Т.А.¹, Лямин А.В.², Кондратенко О.В.², Поликарпова С.В.³, Жилина С.В.⁴,
Фёдорова Н.И.¹, Семькин С.Ю.¹, Чаплин А.В.¹, Коростин Д.О.¹, Маянский Н.А.¹, Чеботарь И.В.¹

ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

³ ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы, 111539, Москва, Россия;

⁴ ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница» Департамента здравоохранения города Москвы, 119049, Москва, Россия

Stenotrophomonas maltophilia является распространённым условно-патогенным возбудителем, относится к группе бактерий, имеющих доказанное клиническое значение в развитии лёгочной инфекции при муковисцидозе. Цель работы – оценка спектра устойчивости к антибиотикам и сиквенс-типовой принадлежности изолятов *S. maltophilia*, выделенных у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации, определение генетических основ выявленной антибиотикорезистентности. Объектами исследования послужили изоляты *S. maltophilia*, выделенные из дыхательных путей 170 пациентов с муковисцидозом. Чувствительность к антибиотикам определяли при помощи тест-систем Sensititre Gram Negative GN2F Plate и интерпретировали согласно критериям Института клинических и лабораторных стандартов США (CLSI). Полногеномное секвенирование проводили на платформе MGISEQ-2000. Для анализа геномов использована программа SPAdes, платформа Galaxy, сервисы ResFinder, Integrall, PubMLST. Штаммы *S. maltophilia* идентифицированы у 24 (14%) пациентов, у одного из пациентов выделено два различающихся штамма. Изоляты принадлежали к 17 сиквенс-типам (ST), в том числе к пяти новым ST. Самым распространённым являлся сиквенс-тип ST4. К цефтазидиму резистентны 60% изолятов, к тикарциллину-клавуланату – 32%, к левофлоксацину – 24%, к триметоприму-сульфаметоксазолу – 12% штаммов. Все изоляты чувствительны к миноциклину. Все штаммы сиквенс-типа ST4 были резистентны или имели промежуточную чувствительность к цефтазидиму и тикарциллину-клавуланату. У двух исследованных изолятов выявлен ген устойчивой к сульфаниламидам дигидроптероатсинтазы (*sulI*). У одного из изолятов ген *sulI* входил в состав интегрона класса I. В составе интегрона, помимо *sulI*, находились гены бета-лактамазы GES-7 (*bla_{GES-7}*) и аминокликозид-модифицирующего фермента AAC(6')-Ib-cr (*aac(6')-Ib-cr*). Самым распространённым сиквенс-типом среди штаммов *S. maltophilia*, выделенных у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации, являлся ST4. Гены плазмидной резистентности выявлены у единичных штаммов и представлены генами *sulI*, *aac(6')-Ib-cr* и *bla_{GES-7}*.

Ключевые слова: *Stenotrophomonas maltophilia*; муковисцидоз; сиквенс-типы; антибиотикорезистентность; интегрон.

Для цитирования: Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Поликарпова С.В., Жилина С.В., Фёдорова Н.И., Семькин С.Ю., Чаплин А.В., Коростин Д.О., Маянский Н.А., Чеботарь И.В. Характеристика изолятов *Stenotrophomonas maltophilia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (5): 315-320. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-315-320>

Для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии; e-mail: ivrin7@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Здравоохранения Российской Федерации по Государственному заданию «Молекулярно-генетические механизмы возникновения и утраты антибиотикорезистентности у актуальных оппортунистических патогенов» (ЕГИСУ НИОКТР № 121060200152-8).

Благодарности. Авторы благодарят Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ за поддержку с методической частью исследования/работы.

Поступила 22.02.2022

Принята к печати 11.03.2022

Опубликовано 21.05.2022

Bocharova Yu.A.¹, Savinova T.A.¹, Lyamin A.V.², Kondratenko O.V.², Polikarpova S.V.³, Zhilina S.V.⁴,
Fedorova N.I.¹, Semykin S.Yu.¹, Chaplin A.V.¹, Korostin D.O.¹, Mayansky N.A.¹, Chebotar I.V.¹

CHARACTERISTICS OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ISOLATES FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS IN RUSSIA

¹Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

²Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia;

³Filatov Municipal Clinical Hospital, 111539, Moscow, Russia;

⁴Morozov City Children's Clinical Hospital, 119049, Moscow, Russia

Stenotrophomonas maltophilia is a common opportunistic microorganism and an important respiratory pathogen in cystic fibrosis (CF). The aim of this study was to determine antimicrobial resistance phenotypes, sequence-types (ST) and genetic determinants of antibiotic resistance in *S. maltophilia* strains recovered from CF patients in Russia.

S. maltophilia isolates recovered from 170 CF patients were analyzed. Minimum inhibitory concentrations of antibacterial agents were determined using Sensititre Gram Negative GN2F plates and the results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. Whole-genome sequencing (WGS) was performed on MGISEQ-2000 platform. SPAdes software, Galaxy, ResFinder, Integrall and PubMLST were used for analysis of WGS data. *S. maltophilia* strains were identified from 24/170 (14%) CF patients. In total, 25 isolates were detected, two strains were isolated from the same patient. The isolates belonged to 17 different STs, including 5 new STs; ST4 was the most prevalent ST. Resistance to ceftazidime was observed in 60% of strains, to ticarcillin-clavulanate – in 32%, to levofloxacin – in 24%, to trimethoprim/sulfamethoxazole – in 12% of strains. All isolates were susceptible to minocycline. All ST4 isolates were resistant or intermediate to ceftazidime and ticarcillin-clavulanate. In two isolates, the *sul1* gene was detected. In one isolate, *sul1* was part of a class 1 integron. The detected integron also contained the *bla*_{GES-7} and *aac(6')-Ib-cr* genes. The ST4 sequence-type was the most prevalent ST among *S. maltophilia* strains recovered from CF patients in Russia. Antibiotic resistance genes, including *sul1*, *bla*_{GES-7} *aac(6')-Ib-cr*, were detected in single strains.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*; cystic fibrosis; sequence type; antibiotic resistance; integron.

For citation: Bocharova Yu.A., Savinova T.A., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Polikarpova S.V., Zhilina S.V., Fedorova N.I., Semykin S.Yu., Chaplin A.V., Korostin D.O., Mayansky N.A., Chebotar I.V. Characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients in Russia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (5): 315-320 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-5-315-320>

For correspondence: Bocharova Yu.A., MD, PhD, Senior researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology; e-mail: ivrin7@gmail.com

Information about authors:

Bocharova Yu.A., <http://orcid.org/0000-0003-0197-0255>;
Savinova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-5484-5098>;
Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>;
Kondratenko O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7750-9468>;
Polikarpova S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3201-0804>;
Zhilina S.V., <https://orcid.org/0000-0003-0084-1013>;
Fedorova N.I., <https://orcid.org/0000-0001-6244-4182>;
Semykin S.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1419-6756>;
Chaplin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1377-7153>;
Korostin D.O., <https://orcid.org/0000-0003-1343-2550>;
Mayansky N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-5313>;
Chebotar I.V., <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Funding. The study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (Project ID121060200152-8).

Acknowledgment. We thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

Received 22.02.2022

Accepted 11.03.2022

Published 21.05.2022

Введение. *Stenotrophomonas maltophilia* – единственный вид рода *Stenotrophomonas*, представителей которого систематически выделяют из инфекционных локусов человека. Являясь условно-патогенным возбудителем, *S. maltophilia* не только представляет реальную опасность для иммунокомпрометированных пациентов, но и является причиной множества тяжёлых заболеваний, которые нередко заканчиваются фатальными исходами. Описаны случаи септического шока, эндокардитов, менингитов, перитонитов, ассоциированных с *S. maltophilia* [1 – 4]. При муковисцидозе (МВ) *S. maltophilia* расценивается в качестве критически опасного патогена, стойкое присут-

ствие которого в мокроте/аспирате служит неблагоприятным прогностическим критерием [5].

Основа патогенетического успеха *S. maltophilia* базируется на сочетании экологической пластичности, наличии достаточного набора факторов патогенности и главное – чрезвычайно широкого спектра природной устойчивости к антибиотикам.

S. maltophilia – бактерии убиквисты, одной из естественных ниш обитания которых является почва, а точнее ризосфера – слой почвы, прилегающий к корневой системе растений [6]. Жизнь в ризосфере означает приспособленность к существованию в быстро

меняющихся природных условиях, включая колебания температуры и влажности, неприхотливость в отношении питания, способность к выживанию в насыщенном антибиотическими субстанциями микробиоме. Совокупность перечисленных свойств обеспечивает адаптационные возможности, позволяющие *S. maltophilia* закрепляться в самых разнообразных объектах, включая организм человека. К важнейшим факторам патогенности *S. maltophilia* следует отнести адгезины (протеин Smf-1 и др.), системы контактной секреции 1, 2, 3, 4, 5, 6-го типов, которые актуальны для реализации острого воспаления, липополисахариды, аппарат биоплёнообразования (включая токсичные для человека экзополисахариды), протеазы, нуклеазы, липазы/фосфолипазы [7]. Согласно мнению экспертов Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) *S. maltophilia* обладает природной резистентностью к бензилпенициллину, цефалоспорином 1-го и 2-го поколения, ампициллину, амоксициллину, амоксициллин-клавуланату, ампициллин-сульбактаму, тикарциллину, цефотаксиму, цефтриаксону, азтреонаму, эртапенему, имипенему, меропенему, аминогликозидам, триметоприму (но не триметоприму-сульфаметоксазолу), фосфомицину, тетрациклину (но не доксициклину, миноциклину и тигециклину), гликопептидам, липогликопептидам, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, рифампицину, оксазолидонам [8]. Кроме природной резистентности *S. maltophilia* быстро приобретает адаптивную резистентность к левофлоксацину, триметоприму-сульфаметоксазолу, миноциклину [9, 10].

В клинике *S. maltophilia* чаще всего ассоциируется с поражениями лёгких при МВ. В настоящее время накоплено достаточно информации о геномных особенностях штаммов *S. maltophilia*, выделенных от пациентов с МВ в различных регионах мира. Считается, что изоляты *S. maltophilia* от пациентов с МВ характеризуются высоким генетическим (сиквенс-типовым) разнообразием без преобладания определённых клональных линий [11]. В Российской Федерации исследований подобного рода не проводилось.

Цель работы – оценка распространения устойчивости к антибиотикам и сиквенс-типовой принадлежности изолятов *S. maltophilia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации, определение генетических основ выявленной антибиотикорезистентности.

Материал и методы. Объектами исследования послужили штаммы *S. maltophilia*, выделенные из мокроты и верхних дыхательных путей пациентов с МВ в январе-феврале 2020 года. Среди пациентов были представители 49 регионов РФ в возрасте от 1 года до 33 лет. Общее количество пациентов составило 170 человек (5,4% от общего числа пациентов с МВ в Российской Федерации) [12]. Штаммы идентифицировали при помощи MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе VITEK MS (bioMérieux). Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков (МПК) определяли с использованием тест-систем Sensititre Gram Negative GNX2F AST Plate (Thermo Fisher Scientific). Результаты интерпретировали, основываясь на рекомендациях Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI; 2020 г.) [13]. В соответствии с критериями интерпретации МПК, рекомендованными CLSI, изоляты разделяли на

три группы: чувствительные («susceptible», S), штаммы с промежуточной чувствительностью («intermediate», I) резистентные («resistant», R).

Для получения бактериальной ДНК использованы суточные культуры *S. maltophilia*, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson, США). Выделение ДНК проводили с использованием наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). ДНК-библиотеки готовили при помощи ультразвуковой фрагментации (Covaris) бактериальной ДНК (400 нг) с последующей репарацией концевых последовательностей и лигированием адаптеров (MGI). Для измерения концентрации бактериальной ДНК и ДНК-библиотек использован прибор Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific). Очистку ДНК-библиотек осуществляли с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman). Полногеномное секвенирование проводили на платформе MGISEQ-2000 (MGI). Длина прочтений составила 250 пар оснований.

Сборку бактериального генома осуществляли при помощи программы SPAdes 3.14 [14]. Для исключения возможности контаминации и контроля полноты сборки использован веб-сервер Contest16S и программу CheckM [15, 16]. Оценку качества сборки проводили при помощи QUAST 5.0 [17]. Для анализа геномов использованы сервисы ResFinder, Galaxy и база данных Integrall [18 – 20]. Сиквенс-тип изолятов определяли по стандартной схеме мультилокусного сиквенс-типирования для *S. maltophilia* с использованием данных полногеномного секвенирования [21].

Результаты. Штаммы *S. maltophilia* обнаружены у 24/170 (14%) пациентов, при этом от одного из пациентов выделено два изолята. Всего выявлено 25 штаммов *S. maltophilia*. Данные полных геномов выявленных изолятов депонированы в базе данных GenBank (BioProject № PRJNA799609).

Исследованные изоляты принадлежали к 17 различным сиквенс-типам (ST), в том числе, к пяти новым ST (рис. 1). Сиквенс-типы ST4 и ST162 представлены семью (28% штаммов) и двумя (8% штаммов) изолятами соответственно, все изоляты выделены от разных пациентов. Выявлено по одному изоляту известных сиквенс-типов ST115, ST116, ST183, ST212, ST365, ST440, ST5, ST500, ST84, ST94 и новых сиквенс-типов ST825, ST824, ST823, ST822. Новый сиквенс-тип ST821 представлен двумя изолятами, выделенными от одного пациента, при этом число однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), обнаруженных при сравнении геномов штаммов ST821, составило 205 SNP, что свидетельствует о штаммовом различии изолятов.

Более половины исследованных штаммов резистентны к цефтазидиму. Резистентность к тикарциллину-клавуланату демонстрировали 32% изолятов, к левофлоксацину – 24%, к триметоприму-сульфаметоксазолу – 12% штаммов. Все изоляты чувствительны к миноциклину. Результаты определения чувствительности к антибиотикам исследованных изолятов *S. maltophilia* представлены в таблице. Все штаммы сиквенс-типа ST4 были резистентны или имели промежуточную чувствительность к цефтазидиму и тикарциллину-клавуланату. Штаммы, резистентные к триметоприму-сульфаметоксазолу, принадлежали к ST4, ST162 и новому ST824.

Гены плазмидной резистентности выявлены у двух изолятов. Изоляты принадлежали к сиквенс-типам ST824 и ST162, содержали в геноме ген, устойчивой к сульфониламидам дигидроптероатсинтазы (*sulI*), резистентны к

Сиквенс-типология принадлежность 25 штаммов *S. maltophilia*, выделенных у пациентов с муковисцидозом

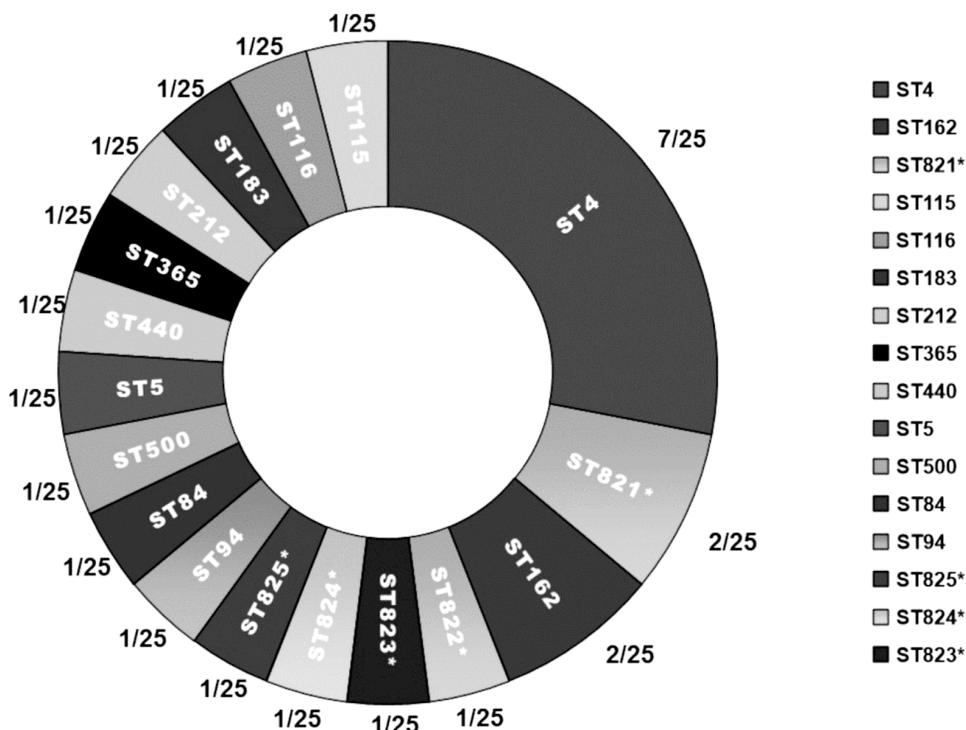


Рис. 1. Сиквенс-типология принадлежность 25 штаммов *S. maltophilia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом. * – Новые сиквенс-типы.



Рис. 2. Интегрон класса 1, обнаруженный в геноме изолята *S. maltophilia* ST162.

триметоприму-сульфаметоксазолу. У одного из изолятов (ST162) ген *sul1* входил в состав интегрона класса 1. Интегрон состоял из нескольких частей: 5'-консервативного сегмента, 3'-консервативного сегмента и варибельного региона (рис. 2). В состав 5'-консервативного сегмента входил ген интегразы *intI1*, в состав 3'-консервативного сегмента – гены *qacEΔ1* и *sul1*. Варибельный регион интегрона представлен генами *bla_{GES-7}* (ген бета-лактамазы GES-7) и *aac(6')-Ib-cr* (ген аминогликозид-модифицирующего фермента AAC(6')-Ib-cr).

Обсуждение. Штаммы *S. maltophilia* обнаружены у 14% пациентов с МВ, что превышает соответствующий показатель, ранее зарегистрированный среди пациентов с МВ в Российской Федерации. По данным Регистра больных МВ Российской Федерации за 2019 год количество случаев высева *S. maltophilia* из респираторного тракта не превышало 9% [12]. Полученные данные соответствуют показателям распространённости *S. malto-*

philia среди респираторных патогенов, высеваемых у пациентов с МВ в США и в большинстве стран Европы (до 16%), за исключением таких стран, как Австрия и Норвегия, где *S. maltophilia* обнаруживается в респираторном тракте почти у 20% пациентов [22, 23].

Исследованные штаммы *S. maltophilia* характеризовались высоким сиквенс-типовым разнообразием и большим количеством новых сиквенс-типов (обнаружено и зарегистрировано пять новых ST). Подобное разнообразие описано и в предыдущих исследованиях. Например, в работе А. Esposito и соавт. [11], среди штаммов *S. maltophilia*, выделенных от пациентов с МВ, выявлено 20 различных сиквенс-типов, в том числе 11 новых ST. Только 5 из 17 обнаруженных нами сиквенс-типов – ST162, ST183, ST4, ST5, ST84 – ранее регистрировались у МВ-пациентов в различных странах, при этом наиболее распространенным являлся сиквенс-тип ST5 [11, 24]. По результатам нашего исследования среди

Чувствительность к антибиотикам штаммов *S. maltophilia*, выделенных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации

Антибиотик	Количество штаммов, абс. (%)		
	Чувствительные штаммы	Штаммы с промежуточной чувствительностью	Резистентные штаммы
Тикарциллин-клавуланат	8 (32)	9 (36)	8 (32)
Цефтазидим	6 (24)	4 (16)	15 (60)
Левифлоксацин	15 (60)	4 (16)	6 (24)
Миноциклин	25 (100)	Нет	Нет
Триметоприм-сульфаметоксазол	22 (88)	-*	3 (12)

Примечание. * – В критериях интерпретации МПК триметоприма-сульфаметоксазола для *S. maltophilia* отсутствует категория «Штаммы с промежуточной чувствительностью».

изолятов *S. maltophilia*, выделенных у пациентов с МВ, преобладал сиквенс-тип ST4 (28% штаммов).

Большинство исследованных штаммов *S. maltophilia* чувствительны к триметоприму-сульфаметоксазолу, левофлоксацину, миноциклину (88%, 60% и 100% чувствительных изолятов, соответственно). К тикарциллину-клавуланату и цефтазидиму чувствительны всего 32% и 24% штаммов, соответственно. Сравнивая полученные данные с данными европейских исследований, следует отметить, что в Европе наиболее эффективными антибиотиками в отношении изолятов *S. maltophilia*, выделенных у МВ-пациентов, являлись, как и в нашей работе, триметоприм-сульфаметоксазол и миноциклин, эффективность левофлоксацина зависела от сиквенс-типовой принадлежности изолята (резистентность к левофлоксацину ассоциирована с принадлежностью к ST179, не обнаруженному в нашем исследовании) [11]. По нашим результатам, все штаммы, принадлежащие к ST4, резистентны или имеют промежуточную чувствительность к тикарциллину-клавуланату и цефтазидиму, что в совокупности с высокой распространённостью ST4 свидетельствует о принадлежности ST4-изолятов к эпидемиологически опасным штаммам *S. maltophilia* с «патогенным» генотипом [25].

Гены плазмидной резистентности обнаружены в геномах всего двух изолятов *S. maltophilia*. Отсутствие чувствительности к антибиотикам у других штаммов может быть связано с наличием альтернативных механизмов резистентности. Устойчивость к триметоприму-сульфаметоксазолу у *S. maltophilia* может быть обусловлена, помимо наличия *sul*-генов, гиперэкспрессией эффлюкс-систем *SmeABC* и *SmeDEF* [26]. Гиперэкспрессия природных бета-лактамаз L1 и L2 ведёт к возникновению устойчивости к тикарциллину-клавуланату, гиперэкспрессия L1 и L2 и/или мутации в генах эффлюкс-системы *SmeGH* – к цефтазидиму [27, 28]. Устойчивость к левофлоксацину у *S. maltophilia* при отсутствии плазмидных *qnr*-генов (гены пептидов, защищающих ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от действия фторхинолонов) связывают с модификациями мишеней действия фторхинолонов (мутации в генах ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) или гиперэкспрессией эффлюкс-систем *SmeDEF* и *SmeVWX* [29].

Интегрон, обнаруженный нами у ST162-изолята, имеет характерное для интегронных класса I строение. Ген интегразы *intI1* входит в состав 5'-консервативного сегмента, 3'-консервативный сегмент представлен генами *sull* и *qacEΔ1* (неполный ген белка, обеспечивающего устойчивость к детергентам) [30]. Варибельный регион включал в себя генные кассеты: *aac(6')-Ib-cr* и *bla_{GES-7}*. Ген *aac(6')-Ib-cr* кодирует аминогликозид-модифицирую-

щий фермент AAC(6')-Ib-cr, способный инактивировать не только аминогликозиды, но и фторхинолоны, и широко распространён среди грамотрицательных бактерий [31]. Ген *bla_{GES-7}* встречается гораздо реже и ранее выявлялся всего у нескольких видов бактерий, включая *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas veronii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* [31, 20]. Бета-лактамаза GES-7 обладает гидролитической активностью в отношении цефалоспоринов и карбапенемов [31]. Поскольку бактерии *S. maltophilia* природно резистентны к данным группам антибиотиков, наличие GES-7 у отдельных штаммов не даёт им преимущества перед другими изолятами, однако, *bla_{GES-7}* в составе интегрона может передаваться при генетических рекомбинациях бактериям других видов и обеспечивать у них формирование резистентного фенотипа [32].

Заключение. Резистентные свойства и сиквенс-типичные характеристики изолятов *S. maltophilia*, изолированных от пациентов с МВ в Российской Федерации, близки к соответствующим общемировым показателям. Выявлен ряд феноменов, которые нуждаются в особом внимании из-за их теоретической новизны и практической значимости. Во-первых, среди часто встречающихся штаммов ST4 (28% в структуре выделенных изолятов) не было ни одного изолята, чувствительного к тикарциллину-клавуланату и цефтазидиму (согласно критериям CLSI). Это свидетельствует о потенциальной эпидемиологической опасности со стороны *S. maltophilia* ST4 на территории России. Во-вторых, некоторые изоляты *S. maltophilia* от пациентов с МВ являются носителями генов плазмидной резистентности к антибиотикам, к которым у *S. maltophilia* имеется природная устойчивость. Такие гены не увеличивают опасность *S. maltophilia* для конкретного пациента, но их обнаружение имеет важное эпидемиологическое значение, поскольку штаммы-носители плазмидной резистентности могут быть источником генов устойчивости для других нозокомиальных возбудителей внутри стационара. Штаммы-носители генов плазмидной резистентности должны активно выявляться системой инфекционного контроля с целью предотвращения распространения антибиотикорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-11, 11-32 см. REFERENCES)

1. Панина М. В., Клясова Г. А., Новичкова Г. А., Байдильдина Д. Д., Литвинов Д. В., Горонкова О. В. и др. Клинические проявления и исход бактериемии, вызванной *Stenotrophomonas maltophilia*, у детей с гематологическими и онкологическими заболеваниями. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2014; 13(2):31-41.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

12. Данные с сайта Всероссийской ассоциации для больных муковисцидозом. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2019 год. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf (дата обращения: январь 2022 г.)

REFERENCES

- Panina M.V., Klyasova G.A., Novichkova G.A., Baidildina D.D., Litvinov D.V., Goronkova O.V. et al. Clinical manifestations and outcome of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in children with hematological and oncological diseases. *Voprosy gematologii/ onkologii i immunopatologii v pediatrii*. 2014; 13(2): 31-41. (in Russian)
- Reynaud Q., Weber E., Gagneux-Brunon A., Suy F., Romeyer-Bouchard C., Lucht F. et al. Late *Stenotrophomonas maltophilia* pacemaker infective endocarditis. *Med. Mal. Infect.* 2015; 45(3):95-7. DOI: 10.1016/j.medmal.2015.01.016.
- Wang C. H., Hsu S. W., Tsai T. H., Wang N. C. An outbreak of trimethoprim/sulfamethoxazole-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* meningitis associated with neuroendoscopy. *J. Med. Sci.* 2014; 34(5):235-7. DOI: 10.4103/1011-4564.143653.
- Millan-Diaz B., Gonzalez-Tabares L., Cobelo-Casas C., Lopez-Vazquez M., Calvino-Varela J. *Stenotrophomonas maltophilia*: A rare cause of peritonitis in capd patients. *Nefrologia*. 2017; 37(6):646-7. DOI: 10.1016/j.nefro.2017.03.018.
- Waters V., Atenafu E.G., Lu A., Yau Y., Tullis E., Ratjen F. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 2013; 12(5):482-6. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.12.006.
- Adegoke A.A., Stenstrom T.A., Okoh A.I. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy. *Front. Microbiol.* 2017; 8:2276. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02276.
- Menetrey Q., Sorlin P., Jumas-Bilak E., Chiron R., Dupont C., Marchand H. *Achromobacter xylooxidans* and *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging pathogens well-armed for life in the cystic fibrosis patients' lung. *Genes (Basel)*. 2021; 12(5):610. DOI: 10.3390/genes12050610.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes. Version 3.3, October 2021. Available at: https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/ (accessed: February 2022).
- Zajac O.M., Tyski S., Laudy A.E. Phenotypic and molecular characteristics of the MDR efflux pump gene-carrying *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated in Warsaw, Poland. *Biology*. 2022; 11(1):105. DOI: 10.3390/biology11010105.
- Baseri Z., Dehghan A., Yaghoubi S., Razavi S. Prevalence of resistance genes and antibiotic resistance profile among *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from hospitalized patients in Iran. *New Microbes New Infect.* 2021; 44:100943. DOI: 10.1016/j.nmni.2021.100943.
- Esposito A., Pompilio A., Bettua C., Crocetta V., Giacobazzi E., Fiscarelli E. et al. Evolution of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis lung over chronic infection: a genomic and phenotypic population study. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1590. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01590.
- Russian Association for patients with cystic fibrosis. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf (accessed: January 2022). (in Russian)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Available at: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed: January 2022).
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Lee I., Chalita M., Ha S.M., Na S.I., Yoon S.H., Chun J. ConTEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017; 67(6):2053-7. DOI: 10.1099/ijsem.0.001872.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015; 25(7):1043-55. DOI: 10.1101/gr.186072.114.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8):1072-5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- ResFinder 4.1. Available at: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder> (accessed: January 2022).
- Galaxy. Available at: <https://usegalaxy.org/> (accessed: January 2022).
- Integrall. The Integron Database. Available at: <http://integrral.bio.ua.pt/> (accessed: January 2022).
- Public databases for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST). Available at: https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_smalltophilia_seqdef (accessed: January 2022).
- Cystic Fibrosis Foundation. 2019 Patient registry annual data report. Available at: <https://www.cff.org/sites/default/files/2021-10/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf> (accessed: January 2022).
- European Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Data report 2019. Available at: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECF-SPR_Report_2019_v1_23Dec2021.pdf (accessed: January 2022).
- Public databases for molecular typing and microbial genome diversity (PubMLST). *Stenotrophomonas maltophilia*. Available at: https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_smalltophilia_isolates&page=query (accessed: January 2022).
- Corlouer C., Lamy B., Desroches M., Ramos-Vivas J., Mehiri-Zghal E., Lemenand O. et al. *Stenotrophomonas maltophilia* healthcare-associated infections: identification of two main pathogenic genetic backgrounds. *J. Hosp. Infect.* 2017; 96(2):183-8. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.02.003.
- Herrera-Heredia S.A., Pezina-Cantu C., Garza-Gonzalez E., Bocanegra-Ibarias P., Mendoza-Olazarán S., Morfin-Otero R. et al. Risk factors and molecular mechanisms associated with trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* in Mexico. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(8):1102-9. DOI: 10.1099/jmm.0.000550.
- Blanco P., Corona F., Martínez J.L. Involvement of the RND efflux pump transporter SmeH in the acquisition of resistance to ceftazidime in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Sci. Rep.* 2019; 9:4917. DOI: 10.1038/s41598-019-41308-9.
- Huang H.H., Chen P.Y., Hu R.M., Lin Y.T., Li L.H., Yang T.C. Impacts of L1 promoter variation and L2 clavulanate susceptibility on ticarcillin-clavulanate susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(11):e01222-18. DOI: 10.1128/AAC.01222-18.
- Azimi A., Rezaei F., Yaseri M., Jafari S., Rahbar M., Douraghi M. Emergence of fluoroquinolone resistance and possible mechanisms in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* from Iran. *Sci. Rep.* 2021; 11:9582. DOI: 10.1038/s41598-021-88977-z.
- Domingues S., da Silva G.J., Nielsen K.M. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob. Genet. Elements*. 2012; 2(5):211-23. DOI: 10.4161/mge.22967.
- The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Available at: <https://card.mcmaster.ca/home> (accessed: January 2022).
- Ghaly T.M., Geoghegan J.L., Tetu S.G., Gillings MR. The peril and promise of integrons: beyond antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* 2020; 28(6):455-64. DOI: 10.1016/j.tim.2019.12.002.