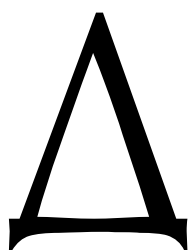


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Том 67
8 • 2022

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

АВГУСТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостоповская 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 из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

Журнал представлен в базе данных Российско-
го индекса научного цитирования (РИНЦ) и в
следующих международных информационно-
справочных изданиях: Abstracts of Microbiology, Adis
International Ltd Reactions Weekly, Chemical Ab-
stracts (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), Thom-
son 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.akc.ru,
www.pressa-rl.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2022. № 8. 429–492.

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. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответст-
венный 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. ЕЛЬ-
ЧАНИНОВА (Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск),
А. KALLNER (Швеция, Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО
(Санкт-Петербург), К.П. КАШКИН (Москва), А.В. КОЗ-
ЛОВ (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"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ Диагностика

Volume 67
8 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

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 Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, 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 Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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. KOCH-
TOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA
(*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*),
V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю., Агафонова Н.Ю.

Особенности механизмов репаративной регенерации костной ткани и информативность маркеров субхондрального ремоделирования при ранних проявлениях первичного гонартроза. 433

Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Маркович А.А., Лебедева А.В., Карамышева Е.И., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е.

Хромогранин В в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями. 440

Аверьянова И.В.

Распространенность и частота встречаемости компонентов метаболического синдрома у жителей-северян. 444

ИММУНОЛОГИЯ

Кузнецова Т.А., Андрюков Б.Г., Половов С.Ф., Гажа А.К.

Современные аспекты иммунопатогенеза ожоговой травмы и иммуно-биохимические маркеры ранозаживления (обзор литературы). 451

МИКРОБИОЛОГИЯ

Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Стилиди И.С., Грачев А.Н.

Диагностический и прогностический потенциал резидентного микробиома немелкоклеточного рака легкого. 458

Пичугова С.В., Розанова С.М., Бейкин Я.Б.

Диагностика бактериоспермии и ее влияние на показатели спермограммы у подростков с варикоцеле. 463

Давидович Н.В., Галиева А.С., Оправин А.С., Гагарина Т.Ю., Малыгина О.Г., Лейхтер С.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А.

Взаимосвязи маркерных пародонтопатогенов с уровнем секреции иммунного компонента sCD14 при воспалительных заболеваниях пародонта. 471

Симонов О.А., Симонова Е.О., Мальчевский В.А.

Пути снижения производственной трудоёмкости применения способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии. 476

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Шаров Т.Н., Будченко А.А., Викторов Д.В., Топорков А.В.

Применение масс-спектрометрического метода для изучения и идентификации клинически значимых вирусов (обзор литературы). 480

Ильин В.К., Соловьёва З.О., Гизингер О.А., Шеблаева А.С., Быстрова О.В., Ловцевич С.М., Бородин И.П.

Сравнение метода ПЦР диагностики и метода масс-спектрометрии микробных маркёров применительно к оценке микробиоты полости рта. 484

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Захарова Н.Б., Годков М.А., Долгов В.В., Эмануэль В.Л., Гильманов А.Ж., Гладилин Г.П.

Учебное видео для подготовки специалистов клинической лабораторной диагностики. 489

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu., Agafonova N.Yu.

Features of osseous regeneration and informative value of subchondral remodeling markers
in early signs of primary gonarthrosis. 433

*Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Markovich A.A., Lebedeva A.V., Karamisheva E.I.,
Delektorskaya V.V., Kushlinskii N.E.*

Chromogranin B in blood serum of patients with neuroendocrine tumors 440

Averyanova I.V.

Occurrence of metabolic syndrome components in northerners 444

IMMUNOLOGY

Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Polovov S.F., Gazha A.K.

Modern aspects of burn injury immunopathogenesis and immuno-biochemical markers
of wound healing (review of literature) 451

MICROBIOLOGY

Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Stilidi I.S., Gratchev A.N.

Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome 458

Pichugova S.V., Rozanova S.M., Beikin Ya.B.

Diagnosis of bacteriospermia and its impact on spermogram parameters in adolescents with varicocele 463

*Davidovich N.V., Galieva A.S., Opravin A.S., Gagarina T.Yu., Malygina O.G., Leikhter S.N., Bashilova E.N.,
Bazhukova T.A.*

Correlation of marker periodontopathogenic bacteria with the immune component sCD14
secretion level in inflammatory periodontal diseases 471

Simonov O.A., Simonova E.O., Malchevskiy V.A.

Ways to reduce the labor intensiveness of applying the method of optical estimation
of microbial cell concentration in suspension 476

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Sharov T.N., Budchenko A.A., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

The application of mass spectrometry method for the study and identification of medically
important viruses (review of literature) 480

Ilyin V.K., Solovieva Z.O., Gizinger O.A., Sheblaeva A.S., Bystrova O.A., Lovtsevitch S.M., Borodin I.P.

Comparison of pcr diagnostic method and mass spectrometry of microbial markers method as applied
to the evaluation of oral microbiota 484

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

Zakharova N.B., Godkov M.A., Dolgov V.V., Emanuel V.L., Gilmanov A.Zh., Gladilin G.P.

Educational video for training specialists in clinical laboratory diagnostics 489

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю., Агафонова Н.Ю.

ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ И ИНФОРМАТИВНОСТЬ МАРКЕРОВ СУБХОНДРАЛЬНОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ РАННИХ ПРОЯВЛЕНИЯХ ПЕРВИЧНОГО ГОНАРТРОЗА

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, г. Саратов, Россия

Одним из важных патогенетических механизмов прогрессирования первичного гонартроза является субхондральное ремоделирование. Роль измененного метаболизма костной ткани при ранних проявлениях суставной патологии до настоящего времени окончательно не выяснена, а информативность биохимических маркеров является дискуссионной. В исследовании приняли участие 103 пациента (64 женщины и 39 мужчин) с 0-I рентгенологическими стадиями гонартроза и 103 здоровых человека (72 женщины и 28 мужчин) в возрасте от 36 до 50 лет. В сыворотке крови определяли концентрации остеокальцина, пиридинолина, телопептидов коллагена I типа, метаболитов витамина D, олигомерного матриксного белка хряща и активность костной щелочной фосфатазы, а также оценивали диагностическую значимость маркеров по результатам ROC-анализа. При 0-I стадиях гонартроза выявили повышение ($p < 0,0001$) концентраций костной щелочной фосфатазы, телопептидов коллагена I типа, олигомерного матриксного белка хряща и нарастание ($p < 0,0002$) остеокальцина в сравнении с группой контроля. По данным ROC-анализа, чувствительность и специфичность телопептидов коллагена I типа составила 98,1 и 79,6 %; остеокальцина – 80,6 и 52,4 %; пиридинолина – 99,0 и 78,6 %, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о значимой роли субхондрального ремоделирования в патогенезе ранних стадий первичного гонартроза. Наиболее перспективными маркерами метаболизма костной ткани на начальных стадиях гонартроза являются пиридинолин и телопептиды коллагена I типа, определяемые в сыворотке крови пациентов.

Ключевые слова: ранние стадии первичного гонартроза; маркеры субхондрального ремоделирования.

Для цитирования: Гладкова Е.В., Ульянов В.Ю., Агафонова Н.Ю. Особенности механизмов репаративной регенерации костной ткани и информативность маркеров субхондрального ремоделирования при ранних проявлениях первичного гонартроза. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (8): 433-439. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-433-439>

Для корреспонденции: Гладкова Екатерина Вячеславовна, канд. биол. наук, нач. отд. фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований; e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках НИОКТР НИИТОН СГМУ «Разработка цифровой персонализированной интеллектуальной системы объективизации субхондрального ремоделирования для ранней диагностики остеоартроза на основе математической модели прогнозирования прогрессирования воспалительно-дегенеративных изменений в опорных соединительных тканях».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.01.2022

Принята к печати 18.02.2022

Опубликовано 15.08.2022

Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu., Agafonova N.Yu.

FEATURES OF OSSEOUS REGENERATION AND INFORMATIVE VALUE OF SUBCHONDRAL REMODELING MARKERS IN EARLY SIGNS OF PRIMARY GONARTHROSIS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education V.I. Razumovsky Saratov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 410012, Saratov, Russia

Subchondral remodeling is an important pathogenic mechanism in primary gonarthrosis progress. The role of altered metabolism of osseous tissue in early signs of articular pathology remains vague, and the informative value of biochemical markers is discussible. Our research involved 103 patients (64 women and 39 men) with 0-I gonarthrosis stages and 103 healthy individuals (72 women and 28 men) of 36 to 50 years old. We measured osteocalcin, pyridinoline, type I collagen telopeptides, vitamin B metabolites, cartilage oligomeric matrix protein concentrations, determined the activity of bone alkaline phosphatase, and diagnostic significance of the markers with the ROC curve. We found the increase ($p < 0.0001$) in bone alkaline phosphatase, type I collagen telopeptides, cartilage oligomeric matrix protein concentrations as well as osteocalcin ($p < 0.0002$) in 0-I gonarthrosis stages as compared to the controls. The ROC curve featured 98.1 and 79.6 percent sensitivity and specificity of type I collagen telopeptides; 80.6 and 52.4 percent of osteocalcin; 99.0 and 78.6 percent of pyridinoline, respectively. These findings suggest the significant role of subchondral remodeling in the pathogenesis of early gonarthrosis stages. Pyridinoline and type I collagen telopeptides are the most informative osseous markers detectable in the serum of patients with early gonarthrosis.

Key words: early gonarthrosis; subchondral remodeling markers.

For citation: Gladkova E.V., Ulyanov V.Yu., Agafonova N.Yu. Features of osseous regeneration and informative value of subchondral remodeling markers in early signs of primary gonarthrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 433-439. (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-433-439>

For correspondence: Gladkova E.V., Cand. Sci. Biol. (PhD), head of the Department of Fundamental, Experimental and Clinical Research, Scientific Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery; e-mail: gladckowa.katya@yandex.ru

Information about authors:

Gladkova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6207-2275>;
Ulyanov V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-9466-8348>;
Agafonova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7920-2112>.

Acknowledgment: *The research was performed within the project 'Pathogenetic specifics, regulatory mechanisms and prognostic value of systemic symptoms of articular and osseous tissue metabolism disorders in early stages of osteoarthritis', Reg. No. AAAA-A18-118102690087-7.*

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

Received 27.01.2022

Accepted 18.02.2022

Published 15.08.2022

Социальная значимость остеоартроза (ОА) крупных суставов обусловлена его широкой распространенностью и экономическим ущербом, наносимым обществу вследствие быстрого прогрессирования и инвалидизации на фоне высокого риска развития мультиморбидных состояний у трудоспособных групп населения [1, 2]. К основным факторам риска возникновения ОА относят женский пол, пожилой возраст, избыточные физические нагрузки, направленные на крупные суставы, генетические детерминанты и др. [2, 3].

Исследователи отмечают, что в возрастной группе от 40 лет в настоящее время насчитывается более 645,1 млн пациентов с симптоматическим ОА коленного сустава – гонартрозом (ГА), а у лиц старше 20 лет только за 2020 год диагноз был впервые установлен 86,7 миллионам пациентов с ГА. При этом пиковые значения по распространенности ОА отмечаются в возрасте 70-79 лет, а в группе пациентов моложе 65 лет более трети заболевших утрачивают работоспособность [1, 4].

Распространенность ОА среди жителей Российской Федерации находится в диапазоне значений от 5% до 18% и составляет порядка четверти от всех заболеваний костно-мышечной системы [5, 6]. Неуклонное увеличение доли лиц с тяжелым прогрессирующим хроническим течением ОА крупных суставов во многом обусловлено поздней обращаемостью пациентов вследствие невыраженной клинической симптоматики начальных стадий заболевания, а также несовершенством диагностических подходов, направленных на верификацию диагноза [7]. Следствием позднего выявления ОА становится необратимое тотальное поражение всех компонентов сустава, включая суставной хрящ (СХ), синовиальную оболочку, капсульно-связочный аппарат, субхондральную кость (СХК), окружающие мышцы [8].

Согласно действующим на территории России клиническим протоколам в качестве «золотого стандарта» диагностики ОА до настоящего времени используется рентгенография [9]. Среди лабораторных методов используют общеклиническое исследование синовиальной жидкости и крови, а также оценивают концентрацию С-реактивного протеина в сыворотке крови. Данные диагностические критерии, по мнению многих авторов, являются недостаточными при выявлении ранних признаков заболевания, соответствующих 0 и I рентгенологическим его стадиям [10].

Известно, что основными патогенетическими механизмами прогрессирования ОА является наличие клеточного стресса, прооксидантного статуса суставных структур, избыточной протеолитической активности и тканевой гипоксии на фоне нарушений регионарной ми-

кроциркуляции и периферической гемодинамики [11].

В мировой практике накоплен достаточный объем наблюдений, касающийся эффективности применения различных диагностических тестов при ОА, включенных в единую классификационную систему BIPED (Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention). Данный ресурс объединяет в себе показатели ремоделирования костной ткани, маркеры деструкции и синтеза внеклеточного матрикса СХ, индикаторы обменных процессов в синовии, цитокины, хемокины, факторы ангиогенеза, а диагностическая ценность ряда тестов подтверждена при проведении исследований различного уровня, в том числе многоцентровых, выполненных на выборках большой численности (1000 и более) [12].

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что основными ранними структурно-метаболическими событиями при ОА являются процессы воспалительной деструкции СХ [13], однако в последние годы появляется все больше свидетельств равноценного участия СХК в реализации начальных стадий заболевания [14]. Результатами исследований подтверждена ведущая роль процессов аномального ремоделирования костной ткани, прилежащей к СХ в патогенезе заболевания, что приводит к нарушениям микроархитектоники костной ткани. Результатом данных событий становится биомеханическое несоответствие показателей жесткости измененных в результате формирования дополнительных участков остеогенеза и усиления процессов остеосклероза уровням нагрузки на СХК. Для дебюта заболевания уже характерно истончение кортикальной пластины, оказывающей косвенное ингибирующее влияние на синтез гликозаминогликанов в СХ. Таким образом, была сформирована концепция более раннего участия СХК, нежели воспалительная деструкция СХ [15]. Известно, что ведущими клеточно-молекулярными факторами костной резорбции при измененных метаболических процессах в СХК при ОА является усиление синтеза остеоклестами молекул RANKL (receptor activator of nuclear factor ligand), а также снижение выработки остеопротегерина (OPG) и угнетение процессов минерализации стержневых и пластинчатых структур в трабекулярной кости, что приводит к возникновению микропереломов [16]. Согласно данной концепции, нарушение структурной целостности и метаболических взаимодействий между СХК и СХ, формирующим единую остеохондральную единицу, является одной из основных причин утраты ЭЦМ СХ, а также возникновения патологической васкуляризации и нейрорегуляции с высвобождением факторов роста и ангиогенеза [17].

Несмотря на глубокое понимание места и роли субхондрального ремоделирования в патогенезе начальных стадий ОА, отдельные аспекты структурно-метаболической перестройки костной ткани изучены недостаточно.

Цель – изучить особенности метаболизма костной ткани и информативность маркеров субхондрального ремоделирования в условиях ранних проявлений первичного остеоартроза крупных суставов.

Материал и методы. При планировании исследования расчет минимальных объемов выборки по всем изучаемым параметрам был произведен с использованием инструмента «Анализ мощности» пакета «Statistica StatSoft», исходя из уровня значимости $\alpha=0,05$ для мощности $1-\beta=0,90$. Основываясь на данных, полученных из открытых литературных источников [18], характеризующих изменения выбранных для изучения параметров лабораторных показателей при ОА, мы предположили, что уровень их отличий исследуемых маркеров в основной группе следует ожидать в диапазоне значений от 5 до 25%, регистрируемых для здоровых лиц. Так, было выявлено, что с целью определения различий концентраций телопептидов коллагена I типа (Serum CrossLaps) при ОА потребуется произвести 102 наблюдения, что позволит установить их повышение на 13%, и 44 наблюдения – для доказательства увеличения данного параметра на 20%. Дальнейшее снижение процента отличия приводило к выборкам объемом меньше 30 объектов. Для установления снижения ОК на 10% потребовалось бы обследовать не менее 34 образцов, полученных от пациентов с ОАП, 91 наблюдение – чтобы установить снижение на 6%, и 131 наблюдение для статистически значимого снижения на 5% от среднего значения в группе контроля. По концентрации пиридинолина (PYD) было получено, что для того, чтобы установить различие в среднем на 25%, необходимо 67 наблюдений, на 20% – 103 наблюдения, а повышение показателя на 15% можно установить по выборке объемом 179 пациентов. В итоге, основываясь на проведенных расчетах при планировании работы и учитывая фактические возможности для сбора данных, необходимый объем выборки в каждой из групп был определен численностью 103 человека.

Таким образом, для участия в исследовании были отобраны 103 пациента основной группы (64 женщины и 39 мужчин) с ранними проявлениями первичного ГА в возрасте от 36 до 50 лет (медиана – 46 лет). В группу контроля были включены 103 здоровых человека того же возраста без заболеваний опорно-двигательной системы. Верификация ГА была осуществлена по результатам комплексного клинико-инструментального обследования, выполненного на основании диагностических критериев ОА, изложенных в Клинических рекомендациях, разработанных Ассоциациями травматологов-ортопедов и ревматологов, и посвященных диагностике и лечению гонартроза [9], а также принимая во внимание алгоритмы, предложенные Американской ассоциацией ревматологов [19]. Критериями исключения из исследования явилось наличие системных заболеваний соединительной ткани, остеопении или остеопороза, хирургических вмешательств в анамнезе за последние 6 месяцев, курсового приема НПВС или антирезорбтивных препаратов за последние 6 месяцев, наличие онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний в стадии обострения, других состояний, которые могли бы повлиять на уровни исследуемых

показателей, величины ИМТ, превышающей 39 кг/м², у женщин – признаки дефицита эстрогенов, менопауза.

При осмотре и опросе пациентов учитывали жалобы на наличие утренней скованности, крепитации при движении в коленных суставах. В процессе определения *status localis* травматологом-ортопедом обращали особое внимание на признаки отека мягких тканей, наличие болевого синдрома при пальпации, а также снижение активной и пассивной амплитуд движения в суставах. При опросе применяли русскоязычную версию анкеты по определению индекса WOMAC (Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index, разработанную в 1988 г. N. Bellamy [20]). Выраженность болевого синдрома оценивали по 100 мм аналоговой шкале ВАШ с градацией от 0 до 10 баллов. Кроме того, принимали во внимание результаты анкетирования с использованием опросника KOSS (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score).

Проводили стандартную рентгенографию коленных суставов в двух проекциях на аппарате Opera Swing (GMM Group, Италия) с интерпретацией результатов в соответствии со шкалой J.H. Kellgren, J.S. Lawrence [21]. Измерение минеральной плотности костной ткани (МПКТ) осуществляли в стандартных зонах: поясничном отделе позвоночника (L1-L4), а также проксимальных отделах бедренных костей методом двухэнергетической абсорбциометрии на денситометре Discovery QRD (Hologic Inc., США) в стандартных зонах.

Мягкотканые компоненты суставов были визуализированы методом УЗИ на аппарате Siemens Acuson S-2000 (Siemens AG, Германия) датчиком 9 МГц, учитывая толщину и характер поверхности СХ, состояние менисков и синовиальной оболочки, наличие выпота в полостях сустава (синовита), особенности связочного аппарата. С целью оценки ЭЦМ СХ проводили МРТ-исследование с применением дополнительного протокола T2 релаксометрии и цветного картирования (Relax MAP) на высокопольном МРТ-аппарате Hitachi Echelon 1.5T (Hitachi Ltd., Япония).

В образцах сыворотки крови, полученных натощак, в пробирки Vacuette с разделительным гелем и активатором образования сгустка, методом твердофазного ИФА на микропланшетном фотометре Anthos 2020 (Biochrome Ltd., Великобритания) при длинах волн 450 и 620 нм, проводили измерения концентраций маркеров метаболизма СХК и СХ. Степень дезорганизации ЭЦМ косвенно оценивали на основании накопления PYD с помощью наборов Serum Pyd EIA MicroVue Bone (Quidel Corp., США). О деградации молекул коллагена I типа судили по уровням С-концевых телопептидов, определяемых методом Serum CrossLaps (CTX-I) Elisa (Immunodiagnostic systems Ltd., США). О процессах костеобразования делали выводы, ориентируясь на изменения концентраций остеокальцина (ОК) (N-MID Osteocalcin Elisa) (Immunodiagnostic systems Ltd., США), а также по активности костного изофермента щелочной фосфатазы – BAP (Metra BAP EIA Kit) (Quidel Corp., США). Учитывая ключевую роль витамина D в регуляции процессов костного метаболизма, осуществляли также определение концентрации в системном кровотоке основного его метаболита – дигидроксивитамина 25-OH-Vitamin D ELISA (DIAsource ImmunoAssays SA, Бельгия). Патогенетическое значение нарушений костного метаболизма при ранних проявлениях первичного

ГА была рассмотрена в контексте воспалительной деструкции СХ, основываясь на поступлении в сыворотку крови олигомерного матричного белка хряща (COMP), концентрация которого определялась также методом ИФА с применением наборов Human Cartilage Oligomeric Matrix Protein Elisa (BioVendor R&D, Чехия).

Статистическая обработка полученных результатов была проведена с использованием пакета программ Statistica StatSoft 13.0. Для проверки гипотезы о нормальном распределении полученных вариационных рядов применяли критерий Колмогорова-Смирнова. Результаты представляли в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (25-75 %). Было установлено, что данные не удовлетворяют нормальному распределению, в связи с чем оценка различий в группах проводилась с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Учитывали различия показателей между опытной и контрольной группой при критическом уровне значимости $p < 0,05$. Сила связи между изучаемыми показателями определялась по значениям коэффициента ранговой корреляции Спирмена при $p < 0,05$. Диагностическая значимость изученных маркеров костного метаболизма оценивалась на основании критериев чувствительности и специфичности, определенных методом ROC-анализа, выполненного в программе SPSS 23.

Результаты. При осмотре у лиц контрольной группы не выявляли каких-либо признаков функциональной недостаточности, отечности или наличия болевых проявлений в области коленных суставов при пальпации. Индекс Лекена в покое в группе здоровых лиц составил 0,5 (0,4; 0,7) баллов, при движении – 2,1 (1,8; 2,4) баллов, суммарное значение индекса KOSS – 99 (98; 99) баллов, значение ВАШ в покое не превышало 1,3 балла (1,0; 1,7), а при движении – 4,9 (3,8; 5,2) баллов. Пациенты основной группы жалоб не предъявляли, однако у некоторых из них при осмотре отмечали незначительные ограничения амплитуды движений, крепитация в коленных суставах. Отмечались отдельные признаки дискомфорта при интенсивных физических упражнениях, а также при действиях, сопряженных с увеличением статической нагрузки на нижние конечности. Индекс Лекена в покое составил у пациентов основной группы 3,9 (3,1; 4,2) баллов, а при движении – 5,7 (4,3; 6,8) баллов, оценка по шкале ВАШ в покое – 8,4 (7,2; 8,9) баллов, при ходьбе – 11,4 (10,3; 12,6) баллов, значения индекса KOSS – 96 (95; 97) баллов. По итогам тестирования по шкале WOMAC глобальному констатировали в контрольной группе – 413 мм, в основной группе – 524 мм. Рентгенография оказалась малоинформативной: только у 9 пациентов основной группы выявляли незначительное сужение толщины суставной щели, соответствующее I стадии ОА. По данным УЗИ у большинства пациентов основной группы визуализировали ровный и четкий надколенник; СХ был ровным с неоднородной поверхностью, у ряда пациентов выявляли дегенеративно измененные медиальные мениски, иногда – признаки лигаментита наружных боковых связок. В 34 случаях обнаруживали незначительное расширение верхнего заворота сустава за счет присутствия небольшого количества однородной жидкости (синовита), что могло свидетельствовать о проявлении локальных признаков воспалительной активности.

MPT-исследование позволило выявить у пациентов основной группы более или менее выраженное увеличение времени T2 релаксации (T2 Time) в наиболее «нагружаемых» зонах СХ, что свидетельствовало об изме-

нении степени гидратации его ЭЦМ, и, возможно, было сопряжено со структурной и пространственной дезорганизацией молекул коллагена II типа. Так, для здоровых лиц группы контроля данный показатель составил в среднем 621 (548-672) усл. ед., в то время, как у лиц основной группы он увеличивался до 708,6 (597-838) усл. ед.

Значения T-критерия при проведении измерений МПКТ методом рентгеновской абсорбциометрии в основной группе пациентов демонстрировали лишь незначительные отклонения от нормальных значений, не превышающие $\pm 1,0$ SD, что соответствовало нормальным значениям. Однако, в данной группе обследованных лиц отмечали признаки снижения уровня D-OH 25, медианное значение которого составило 19,5 нг/мл в отличие от группы контроля – 52,9 нг/мл.

При попарном сравнении полученных результатов с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни у пациентов основной группы отмечали существенное ($p < 0,0002$) повышение уровня основного неколлагенового белка ОК: 24,05 (21,64-25,22) нг/мл против контрольных значений: 20,73 (14,90-25,59) нг/мл. При ранних проявлениях ГА констатировали также увеличение ($p < 0,0001$) активности ВАР до 31,87 (29,77; 35,11) ед/л в отличие от значений, имевшихся в группе здоровых лиц: 23,47 (21,62; 25,57) ед/л. Об интенсификации процессов ремоделирования костной ткани в основной группе свидетельствовало выраженное ($p < 0,0001$) повышение концентраций телопептидов Serum CrossLaps в сыворотке крови: 0,790 (0,656; 0,873) нг/мл против 0,315 (0,251; 0,378) нг/мл в группе здоровых лиц. Начальные стадии заболевания сопровождались нарастанием поступления в системный кровоток молекул Serum PYD ($p < 0,0001$) до 6,97 (5,65; 8,44) нг/мл по сравнению с группой здоровых лиц – 2,41 (1,49; 3,26) нг/мл. Об активизации процессов воспалительной деструкции внеклеточного матрикса суставного хряща в дебюте ОА свидетельствовало также выраженное ($p < 0,0001$) увеличение концентрации в сыворотке крови пациентов основной группы молекул COMP до 946 (862; 1081) нг/мл в отличие от показателей, имевшихся у здоровых лиц группы контроля: 496 (374; 597) нг/мл.

Таким образом, результаты исследований выявили существенное изменение концентраций маркеров субхондрального ремоделирования и косвенные признаки интенсификации деструкции хрящевой ткани. Следующим этапом исследования стало определение маркеров, подлежащих проведению ROC-анализа с целью выявления прогностической ценности изученных биохимических маркеров. При анализе медиан и межквартильного диапазона для показателей D-OH25 и ВАР были выявлены ограничения для применения ROC-анализа, т.к. интервалы значений не имели пересечений, в связи с чем была оценена общая диагностическая сила остеокальцина (OK), Serum CrossLaps и Serum PYD. Для достижения данной цели воспользовались методом оценки качества моделей с помощью показателя AUC (Area Under Curve) для ROC-кривой (табл. 1). Согласно общепринятой классификации, диагностически ценными считаются показатели с $AUC > 0,7$.

С целью определения эффективности изученных маркеров при выявлении ранних проявлений первичного ГА для каждого из показателей был определен диагностический порог, чувствительность и специфичность методов (табл. 2).

Опираясь на данные ROC-анализа, было продемонстрировано, что определение концентрации ОК в сыворотке крови позволяет выявлять начальные проявления первичного ОА у 80,6% пациентов или констатировать отсутствие суставной патологии в 52,4% случаев. Для показателей Serum CrossLaps и Serum PYD порог отсечения составил 0,38 и 3,52, что позволяло выявлять суставную патологию у 98,1 и 99% пациентов или отвергать ее наличие в 79,6 и 78,6% в группе здоровых лиц соответственно.

Наглядно диагностические характеристики изученных параметров представлены на графике (см. рисунок).

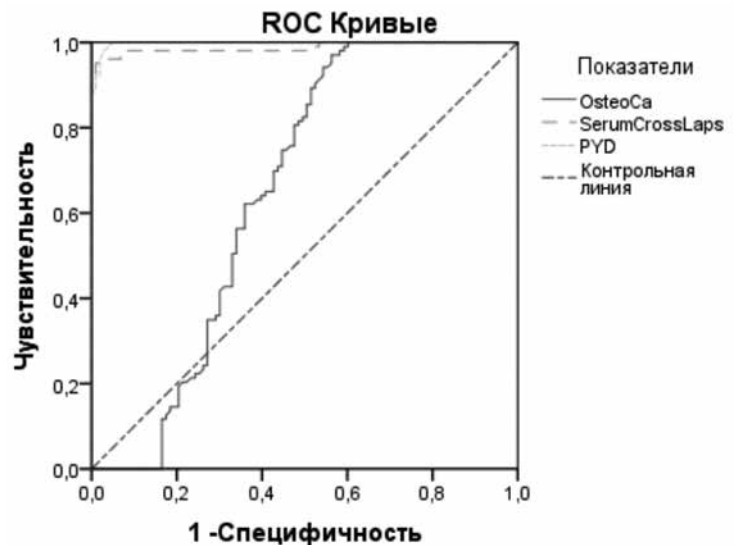
Как следует из рисунка, ОК демонстрирует умеренную прогностическую ценность при выявлении ранних стадий первичного ГА, исходя из особенностей расположения ROC-кривой на графике и значения AUC, равного 0,650 (см.табл.1). Пересечение кривой диагонали является следствием более высокой дисперсии в основной группе, по сравнению с контролем. В то же время, тесты Serum CrossLaps и Serum PYD со значениями 0,98 и 0,99, соответственно, имеют, согласно общепринятой оценочной шкале, отличное качество.

Обсуждение. Согласно определению, сформулированному Всемирной организацией здравоохранения, в качестве биомаркеров патологического процесса можно рассматривать любой способ объективизации реакции организма (физиологической, функциональной, биохимической, клеточной и молекулярной), который позволяет на основании индивидуального ответа в условиях действия повреждающих факторов различного уровня получать информативный диагностический и прогностический ответ [22].

Сложность этиопатогенеза первичного ОА крупных суставов предопределяет необходимость создания научно-практических обоснований к разработке персонализированных диагностических подходов, основанных на применении биомаркеров, отражающих состояние скелетных соединительных тканей. Основными требованиями, предъявляемыми к созданию новых диагностических стратегий, являются: малая инвазивность исследований, максимальная информативность, обеспечиваемая воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью

лабораторных тестов [23]. Диагностическая и прогностическая ценность новых технологий должна стать платформой для создания терапевтических стратегий, основной целью которых является повышение качества жизни пациентов с заболеваниями крупных суставов [24]. Сыворотка крови является информативной и доступной для проведения комплексных исследований биологической средой, интегрально отражающей основные метаболические и иммунные события, происходящие в организме человека в условиях как развернутых, так и манифестных стадий ОА. Так, определение сывороточных концентраций белковых молекул их фрагментов, выполняющих структурную роль или обеспечивающих межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия, позволяют делать выводы об уровне системного воспаления, особенностях иммунного ответа и структурных нарушениях в заинтересованных тканевых структурах.

Оценивая полученные в ходе проведения исследования результаты измерений концентраций биохимических маркеров в сыворотке крови пациентов с ранними проявлениями первичного ГА, нами были выявлены су-



ROC-кривые для маркеров ремоделирования скелетных соединительных тканей при ранних проявлениях первичного гонартроза.

Таблица 1

Оценка прогностической точности ROC-кривой диагностической эффективности биохимических маркеров костного метаболизма при ранних проявлениях первичного гонартроза

Показатели	Площадь (AUC)	p	95% доверительный интервал
Концентрация остеокальцина в сыворотке крови	0,650±0,041	<0,0001	0,570-0,730
Концентрация Serum CrossLaps в сыворотке крови	0,988±0,007	<0,0001	0,973-1,000
Концентрация пиридинолина (PYD) в сыворотке крови	0,998±0,002	<0,0001	0,950-0,990

Таблица 2

Диагностический порог, чувствительность и специфичность маркеров субхондрального ремоделирования в диагностике ранних стадий первичного гонартроза

Показатели	Величина cutoff (диагностический уровень)	Чувствительность, %	Специфичность, %
Концентрация остеокальцина в сыворотке крови	21,18	80,6	52,4
Концентрация Serum CrossLaps в сыворотке крови	0,38	98,1	79,6
Концентрация пиридинолина в сыворотке крови	3,52	99	78,6

существенные изменения метаболизма костной ткани, о чем свидетельствовало повышение концентраций ВАР, ОК, Serum PYD, Serum CrossLaps. Согласно данным, представленным в литературных источниках, итогом субхондрального ремоделирования при ОА является нарушение микроархитектоники СХК вследствие аномальной минерализации внеклеточного матрикса кости и несостоятельности функциональной активности остеобластов с нарушением их дифференцировки [14]. Об активации ранней фазы клеточного цикла остеобластов в группе пациентов с начальными стадиями первичного ГА могло косвенно свидетельствовать выявленное нами увеличение активности ВАР по сравнению с данными, имевшимися в контрольной группе. Кроме того, у пациентов с ранними проявлениями ОА были усилены процессы дезорганизации внеклеточного костного матрикса, что сопровождалось существенным увеличением поступления в системный кровоток телопептидов коллагена I типа Serum CrossLaps. Диагностическая ценность данного маркера (98 %) подтверждена результатами проведенного ROC-анализа [25].

Существенное повышение сывороточных концентраций межмолекулярных «сшивок» Serum PYD у лиц основной группы может указывать на пространственную и структурную дезорганизацию всей коллагеновой сети, являющейся не только основным стабилизирующим структурным элементом суставных компонентов, но и ключевым регуляторным звеном при осуществлении морфогенеза хрящевой и костной тканей [26]. Согласно определению диагностической значимости, чувствительность маркера Serum PYD достигает 99%, что позволяет рассматривать его использование при раннем ГА в качестве перспективного способа объективизации воспалительной деструкции соединительнотканых компонентов пораженных суставов. Интенсификация необратимых потерь внеклеточного матрикса СХ также была косвенно подтверждена на основании выявления повышенных концентраций молекул COMP в сыворотке крови пациентов основной группы.

Выводы.

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Ранние бессимптомные проявления первичного остеоартроза коленных суставов сопровождаются существенными изменениями метаболизма костной ткани и характеризуются как усилением костной резорбции, так и интенсификацией процессов костеобразования.

2. Начальные стадии первичного ГА сопровождаются существенным увеличением концентрации в сыворотке крови пациентов костного изофермента щелочной фосфатазы (ВАР), остеокальцина (ОК), пиридинолина (Serum PYD) и фрагментов коллагена I типа Serum CrossLaps на фоне повышения уровня олигомерного матриксного белка хряща (COMP).

3. Наибольшая диагностическая значимость при ранних проявлениях первичного гонартроза принадлежит Serum CrossLaps и Serum PYD, как высокочувствительным маркерам по данным ROC-анализа.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5, 7, 11, 12, 19, 20, 23, 24, 26 см. REFERENCES)

2. Мендель О.И., Наумов А.В., Алексеева Л.И., Верткин А.Л., Шамуилова М.М. Коморбидность при остеоартрозе: рациональные подходы к лечению больного. *Русский медицинский журнал*. 2009; 17(21): 1472-5.

3. Филимонова О.Г., Леушина Е.А. Частота сопутствующей патологии у больных остеоартрозом. *Евразийское научное объединение*. 2021; 8(78): 135-7.
6. Елисеева Л.Н., Ждамарова О.И., Бледнова А.Ю., Карташова С.В., Бочарникова М.И. Преимущества использования гиалуроната натрия при суставной патологии мелких суставов у полиморбидных пациентов. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение*. 2020; 4(2): 95-100. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-2-95-100.
8. Кругляк Л.Г. Артроз. Самые эффективные методы лечения. СПб: Крылов; 2010.
9. Насонов Е.Л., Галушко Е.А., Алекберова З.С. Российские клинические рекомендации. Ревматология. Насонов Е.Л., ред. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2020: 42-50.
10. Клинические рекомендации «Гонартроз» (утв. Минздравом России 21.09.2021 г.) Источник: <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-gonartroz-utv-minzdravom-rossii/> (дата обращения 26.01.2022).
11. Гладкова Е.В. Роль системы матриксных металлопротеиназ в патогенезе ранних и поздних проявлений гонартроза. *Российский открытый медицинский журнал*. 2020; 9(3): 302. DOI: 10.15275/ruomj.2020.0302.
13. Гладкова Е.В., Ромакина Н.А., Бабушкина И.В., Белова С.В., Персова Е.А. Роль нарушений ремоделирования гиалинового хряща в патогенезе ранних стадий остеоартроза коленных суставов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2019; (1): 46-9. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.1.46-49.
14. Кабалык М.А. Биомаркеры и участники ремоделирования субхондральной кости при остеоартрозе. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2017; (1): 36-41. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.1.37-41.
15. Мазуров В.И., Трофимов Е.А., Трофимова А.С. Влияние различных комбинированных медикаментозных методов лечения на клинические проявления гонартроза и показатели Т2-картирования хряща. *Доктор.Ру*. 2017; 10(139): 53-6.
16. Новаков В.Б., Новакова О.Н., Чурносоев М.И. Факторы риска и молекулярные основы этиопатогенеза остеоартроза коленного сустава (обзор литературы). *Гений ортопедии*. 2021; 27(1): 112-20. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-112-120.
17. Егизарян К.А., Данилов М.А., Абдусаламов Р.М., Флджян Г.А. Внутрикостное и внутрисуставное введение обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении остеоартроза коленного сустава. *Кафедра травматологии и ортопедии*. 2020; (1): 5-12. DOI: 10.17238/issn2226-2016.2020.1.5-12.
18. Карякина Е.В., Гладкова Е.В., Пучиньян Д.М. Структурно-метаболические особенности суставных тканей в условиях дегенеративной деструкции и ревматоидного воспаления. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2019; 105(8): 989-1001. DOI: 10.1134/S0869813919080065.
21. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Чашин В.П., Гудков А.Б. Научные принципы применения биомаркеров в медико-экологических исследованиях (обзор литературы). *Экология человека*. 2019; 26(9): 4-14. DOI: 10.33396/1728-0869-2019-9-4-14.
22. Мирошниченко И.И., Птицина С.Н. Биомаркеры в современной медико-биологической практике. *Биомедицинская химия*. 2009; 55(4): 425-40.
25. Кабалык М.А. Способ диагностики остеоартроза коленного сустава. Патент РФ № RU2644551; 2018.

REFERENCES

1. Białkowska M., Stołtny T., Pasek J., Mielnik M., Szyluk C., Baczyński K., Hawranek R., Koczy-Baron A., Kasperczyk A., Cieślak G., Koczy B. The Influence of hip arthroplasty on health related quality of life in male population with osteoarthritis hip disease. *Wiad Lek*. 2020; 73(12): 2627-33. DOI: 10.36740/WLek202012113.
2. Mendel O.I., Naumov A.V., Alekseeva L.I., Vertkin A.L., Shamuilova M.M. Comorbidity in osteoarthritis: rational approaches to the treatment of patient. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 17(21): 1472-5. (in Russian)

3. Filimonova O.G., Leushina E.A. The frequency of concomitant pathology in patients with osteoarthritis. *Evrasiyskoe Nauchnoe Ob'edinenie*. 2021; 8(78): 135-7. (in Russian)
4. Cui A., Li H., Wang D., Zhong J., Chen Y., Lu H. Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies. *eClinical Medicine*. 2020; 29-30: 100587. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100587.
5. Madry H., Luyten F.P., Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2012; 20(3): 407-22. DOI: 10.1007/s00167-011-1705-8.
6. Eliseeva L.N., Zhdamarova O.I., Blednova A.Yu., Kartashova S.V., Bocharnikova M.I. The advantages of sodium hyaluronate for small joint disorders in patients with comorbidities. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie*. 2020; 4(2): 95-100. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-2-95-100. (in Russian)
7. Roos E.M., Lohmander L.S. The Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS): from joint injury to osteoarthritis. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2003; (1): 64.
8. Kruglyak L.G. [Artroz. Samye effektivnye metody lecheniya]. St.Petersburg: Krylov; 2010. (in Russian)
9. Nasonov E.L., Galushko E.A., Alekberova Z.S. [Rossiyskie klinicheskie rekomendatsii. Revmatologiya]. Nasonov E.L., ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2020. (in Russian)
10. «Klinicheskie rekomendatsii «Gonartroz» (app. By the Russian Federation Ministry of Healthcare). Available at <https://legalacts.ru/doc/klinicheskie-rekomendatsii-gonartroz-utv-minzdravom-rossii/> (accessed Jan. 26, 2022). (in Russian)
11. Gladkova E.V. The role of matrix metalloproteinases in early and late gonarthrosis manifestations. *Rossiyskiy otkrytyy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 9(3): 302. DOI: 10.15275/rusomj.2020.0302. (in Russian)
12. Visconti V.V., Greggi C., Fittipaldi S., Casamassima D., Tallarico M., Romano F., Botta A., Tarantino U. The long pentraxin PTX3: a novel serum marker to improve the prediction of osteoporosis and osteoarthritis bone-related phenotypes. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2021; 16(1): 288. DOI:10.1186/s13018-021-02440-3.
13. Gladkova E.V., Romakina N.A., Babushkina I.V., Belova S.V., Persova E.A. The role of derangements in hyaline cartilage remodeling in pathogenesis of the early stages of knee osteoarthritis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2019; (1): 46-9. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.1.46-49. (in Russian)
14. Kabalyk M.A. Biomarkers of subchondral bone remodeling in osteoarthritis. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; (1): 36-41. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.1.37-41. (in Russian)
15. Mazurov V.I., Trofimov E.A., Trofimova A.S. The effect of various multi-drug regimens on clinical manifestations of osteoarthritis of the knee and parameters of t2 mapping of the knee cartilage. *Doktor. Ru*. 2017; 10(139): 53-6. (in Russian)
16. Novakov V.B., Novakova O.N., Churnosov M.I. Risk factors and molecular entities of the etiopathogenesis of the knee osteoarthritis (review of literature). *Geniy ortopedii*. 2021; 27(1): 112-20. DOI: 10.18019/1028-4427-2021-27-1-112-120. (in Russian)
17. Egiazaryan K.A., Danilov M.A., Abdusalamov R.M., Fldzhjan G.A. Intraosseous and intra-articular injection of platelet-rich plasma in the treatment of osteoarthritis of the knee joint. *Kafedra travmatologii i ortopedii*. 2020; (1): 5-12. DOI: 10.17238/issn2226-2016.2020.1.5-12. (in Russian)
18. Karyakina E.V., Gladkova E.V., Puchinyan D.M. Articular tissue structure and metabolic features under degenerate destruction and rheumatoid inflammation conditions. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2019; 105(8): 989-1001. DOI: 10.1134/S0869813919080065. (in Russian)
19. Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D., Brandt K. et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of the arthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986; 29(8): 1039-49.
20. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol*. 1988; 15(12):1833-40.
21. Kellgren J.H., Lawrence J.S. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis*. 1957; (16): 494-502. DOI: 10.1136/ard.16.4.494.
22. Zaitseva N.V., Zemlyanova M.A., Chashchin V.P., Gudkov A.B. Scientific principles of use of biomarkers in medico-ecological studies (review of literature). *Ekologiya cheloveka*. 2019; 26(9): 4-14. DOI: 10.33396/1728-0869-2019-9-4-14. (in Russian)
23. Miroshnichenko I.I., Ptitsina S.N. Biomarkers in the modern medical and biologic practice. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; 55(4): 425-40. (in Russian)
24. Bianchi J., Gonçalves J.R., de Oliveira Ruellas A.C., Ashman L.M., Vimort J-B., Yatabe M. et al. Quantitative bone imaging biomarkers to diagnose temporomandibular joint osteoarthritis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2021; 50(2): 227-35. DOI: 10.1016/j.ijom.2020.04.018.
25. Kabalyk M.A. Method for diagnosing osteoarthritis of the knee joint. Patent RF No. RU2644551; 2018. (in Russian)
26. Ok S.-M., Lee S.-M., Park H.R., Jeong S.-H., Ko C.C., Kim Y.-I. Concentrations of CTX I, CTX II, DPD, and PYD in the urine as a biomarker for the diagnosis of temporomandibular joint osteoarthritis: a preliminary study. *CRANIO*. 2018; 36(6): 366-72. DOI: 10.1080/08869634.2017.1361624.

Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Маркович А.А., Лебедева А.В., Карамышева Е.И., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е.

ХРОМОГРАНИН В В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115552, Москва, Россия

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой гетерогенную группу неоплазий из клеток диффузной нейроэндокринной системы. Хромогранин В (ХгВ) является кислым белком семейства гранинов, который аналогично ХгА может быть использован для выявления опухолей нейроэндокринного происхождения. Представлены анализ уровней и оценка диагностической эффективности ХгВ в сыворотке крови больных НЭО различных локализаций.

Обследованы пациенты с НЭО (n=121), ранее не получавшие специфического лечения следующих локализаций: 74 – поджелудочная железа, 20 – желудок, 12 – толстая кишка, 15 – другие локализации (легкие, простата, молочная железа, НЭО без выявленного первичного очага). В качестве контроля обследовали 54 практически здоровых доноров. Определение ХгВ в сыворотке крови проводили методом ИФА в плазменном формате на анализаторе ВЕР 2000 с использованием стандартизованной тест-системы Human Chromogranin B (USCN, КНР). Выявили, что уровни ХгВ в общей группе НЭО (медиана 18,9 нг/мл) были статистически значимо выше, чем в контрольной группе (8,8 нг/мл). Наиболее высокая медиана маркера обнаружена в группе больных НЭО толстой кишки (21,2 нг/мл), что превышало медиану контрольной группы более чем в 2,4 раза. По данным ROC-анализа в общей группе НЭО относительно контрольной группы площадь под кривой AUC составила 0,88 (95%ДИ 0,83-0,929). При пороговом уровне ХгВ 15,8 нг/мл диагностическая чувствительность составила 69,4% при специфичности 96,3%. Наиболее высокая диагностическая чувствительность была характерна для группы НЭО толстой кишки (75,0%) и поджелудочной железы (71,2%). Проведенное исследование показало значимость ХгВ как потенциального биохимического маркера, альтернативного ХгА, при НЭО различных локализаций.

Ключевые слова: хромогранин В; нейроэндокринные опухоли; опухолевый маркер.

Для цитирования: Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Маркович А.А., Лебедева А.В., Карамышева Е.И., Делекторская В.В., Кушлинский Н.Е. Хромогранин В в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 440-443. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-440-443>

Для корреспонденции: Любимова Нина Васильевна, д-р биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. клин. биохимии; e-mail: biochimia@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 30.05.2022

Принята к печати 10.06.2022

Опубликовано 15.08.2022

Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Markovich A.A., Lebedeva A.V., Karamisheva E.I., Delektorskaya V.V., Kushlinskii N.E.

CHROMOGRANIN B IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH NEUROENDOCRINE TUMORS

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Russian Federation, 115552, Moscow, Russia

Neuroendocrine tumors (NETs) are a heterogeneous group of neoplasms from cells of the diffuse neuroendocrine system. Chromogranin B (CgB) is an acidic protein of the granin family, which can be used to detect the tumours of neuroendocrine nature. Analysis of levels and evaluation of the diagnostic efficiency of CgB in the blood serum of patients with NETs of various localizations. Patients with NETs (n=121) without specific treatment were examined. In the study were presented next localizations: 74 – pancreas, 20 – stomach, 12 – large intestine, 15 – other localizations (lungs, mammary gland, prostate gland, NETs with unidentified primary). 54 practically healthy donors were examined as control group. The determination of CgB in blood serum was performed with ELISA method on BEP 2000 analyzer using a standardized test system Human Chromogranin B (USCN, China). CgB levels in common NET group (median 18.9 ng/mL) were statistically significantly higher than in the control group (8.8 ng/mL). The highest median was obtained in group of intestinal NETs (21.2 ng/mL), which exceeded the median of the control group by more than 2.4 times. According to ROC analysis in the common NET group relative to the control group, the area under the curve AUC was 0.88 (95% CI 0.83-0.929). According to cut-off level of CgB – 15.8 ng/mL, the diagnostic sensitivity was 69.4%, with a specificity of 96.3%. The highest diagnostic sensitivity was in the group of the intestinal NETs (75.0%) and pancreas (71.2%). The study showed the significance of CgB as a potential biochemical marker of NETs with various localizations, alternative to CgA.

Key words: chromogranin B; neuroendocrine tumors; biochemical marker.

For citation: Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Markovich A.A., Lebedeva A.V., Karamisheva E.I., Delektorskaya V.V., Kushlinskii N.E. Chromogranin B in blood serum of patients with neuroendocrine tumors. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 440-443 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-440-443>

For correspondence: Lyubimova Nina Vasilyevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Lyubimova N.V., <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>;
Timofeev Yu.S., <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>;
Markovich A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5548-1724>;
Lebedeva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5881-1795>;

Karamisheva E.I., <https://orcid.org/0000-0001-8791-5358>;
Delektorskaya V.V., <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.05.2022
Accepted 10.06.2022
Published 15.08.2022

Введение. Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой крайне гетерогенную группу новообразований, происходящих из клеток диффузной нейроэндокринной системы, для которых свойственна продукция биологически-активных соединений [1–4]. В настоящее время в качестве маркеров НЭО представлена большая группа белков, пептидов и биогенных аминов, среди которых наиболее востребованным является хромогранин А (ХгА) [5–10]. Однако недостаточная диагностическая эффективность используемых маркеров обуславливает поиск новых биохимических факторов в качестве потенциальных биомаркеров НЭО [2, 11, 12].

Одним из таких соединений является хромогранин В (ХгВ) – белок семейства гранинов/секретогранинов, которые накапливаются в секреторных гранулах, формирующихся в различных типах клеток диффузной нейроэндокринной системы. По своей химической природе ХгВ представляет собой растворимый кислый белок, состоящий из 657 аминокислотных остатков, который является более стабильным по сравнению с ХгА, включающим в себя 439 аминокислотных остатков. Как и ХгА, ХгВ и его производные (секретолитин, хромабацин и т.д.) участвуют в различных регуляторных процессах в эндокринной и сердечно-сосудистой системах, однако до настоящего времени их функции остаются до конца не изученными [13–15].

В литературе представлены данные о большей специфичности ХгВ по сравнению с другими маркерами НЭО. Так, в отличие от ХгА, на секрецию ХгВ не влияют антисекреторные препараты (ингибиторы протонной помпы), которые часто используют в лечении больных НЭО поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта, а также такие факторы, как почечная и сердечная недостаточность [13].

В настоящее время существуют отдельные публикации, посвященные анализу сывороточных уровней ХгВ у больных НЭО, в которых представлены достаточно противоречивые данные [14–16]. В этом аспекте, целесообразно расширение исследований ХгВ как биохимического маркера опухолей нейроэндокринной природы, альтернативного ХгА.

Цель настоящего исследования – анализ уровней и оценка диагностической эффективности ХгВ в сыворотке крови больных НЭО различных локализаций.

Материал и методы. В исследование включены 121 больной НЭО, которые не получали какого-либо противоопухолевого лечения до поступления в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Среди пациентов с НЭО было 89 женщин и 32 мужчины, медиана возраста составила 60,2 (49,8–65,7) года. В контрольную группу вошли 54 практически здоровых донора, среди которых 34 женщины и 20 мужчин, медиана возраста 45,5 (32,5–60,0) лет.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют эти-

ческим стандартам этического комитета организации (протокол № 6 от 12.04.2022 г.) и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие.

Обследованные больные составили 3 группы с локализацией НЭО в поджелудочной железе ($n=74$), желудке ($n=20$) и толстой кишке ($n=12$). Также была выделена группа с различными локализациями НЭО, в которую вошли 15 больных НЭО легкого, простаты и молочной железы, а также НЭО из неустановленного первичного очага. Среди общей группы больных НЭО у 36 пациентов отмечены клинические признаки карциноидного синдрома. У 60 больных НЭО были выявлены метастазы в печени и у 11 – в лимфоузлов. У большинства пациентов проводили оценку степени злокачественности НЭО по Grade, при этом у 17 больных отмечена степень злокачественности G1, у 50 – G2 и у 20 – G3.

Уровни ХгВ определяли методом иммуноферментного анализа в автоматическом формате на анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens, Германия) с использованием стандартизированной тест-системы Human Chromogranin B (USCN Clone Cloud Inc, КНР) в сыворотке крови, взятой натощак из кубитальной вены. Статистический анализ проводили с использованием комплекта программ Statistica 10 (непараметрические методы исследования) и SPSS (ROC анализ).

Результаты и обсуждение. Сывороточные концентрации ХгВ определены у 121 больного НЭО, при этом медиана уровня маркера (18,95 нг/мл) с высокой степенью статистической значимости ($p=0,00000001$) превышала медиану, полученную в контрольной группе (8,81 нг/мл).

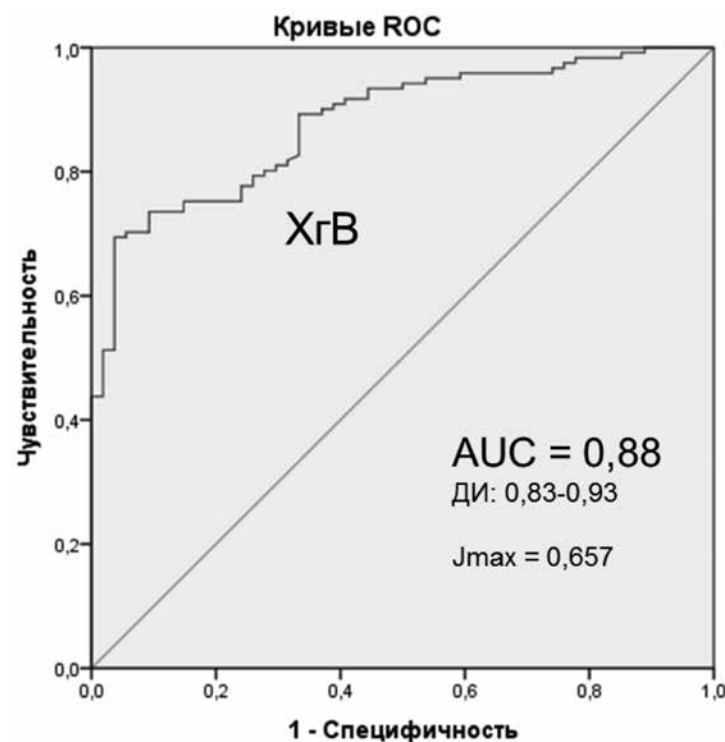
Подробные результаты анализа ХгВ в различных группах больных НЭО приведены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, при всех анализируемых нами локализациях уровни ХгВ статистически значимо отличались от такового показателя в контрольной группе. Наиболее высокая медиана уровня ХгВ выявлена в группе больных НЭО толстой кишки (21,23 нг/мл), что статистически значимо превышало медиану маркера в контроле более чем в 2,4 раза ($p=0,000001$). Степень повышения секреции ХгВ в других группах больных НЭО была несколько ниже (до 2 раз), однако также статистически значимо отличалась от контрольной группы ($p=0,000106$). Статистических различий между полученными медианами ХгВ в отдельных группах пациентов не выявлено.

Медиана концентрации ХгВ у больных с метастазами в печени (21,3 нг/мл) была статистически значимо выше, чем у больных с локализованными формами заболевания (17,2 нг/мл; $p=0,044$). Уровни ХгВ у больных с метастатическим поражением лимфоузлов не показали статистически значимых отличий от больных НЭО с метастазами в печени и локализованными формами НЭО ($p>0,05$). При этом, как при локализованных формах НЭО, так и при

НЭО с метастатическим поражением печени/лимфоузлов уровни ХгВ статистически значимо превышали показатель маркера в контрольной группе ($p < 0,00001$).

Сывороточные уровни ХгВ, выявленные в насто-



ROC-анализ ХгВ в общей группе больных НЭО относительно контрольной группы.

Таблица 1

Уровни ХгВ в сыворотке крови больных НЭО и в контрольной группе

Группы обследованных	n	Медиана	Квартили	Интервал мин-макс	p
Общая группа НЭО	121	18,95	14,21–25,9	3,38–47,93	0,0000001*
Поджелудочная железа	74	19,60	14,70–26,01	4,16–47,93	0,0000001*
Желудок	20	16,60	11,07–21,70	3,38–36,00	0,000106*
Толстая кишка	12	21,23	15,45–28,00	9,45–39,12	0,000001*
Различные локализации	15	19,61	14,64–4,06	9,50–38,48	0,000001*
Карциноидный синдром +	36	17,56	12,60–23,57	8,20–32,36	0,0000001*
Карциноидный синдром –	85	19,60	14,76–26,01	3,38–47,93	0,0000001*
МТС в печени	60	21,32	15,30–27,20	6,24–47,93	0,0000001* 0,044**
МТС в лимфоузлах	11	23,34	12,54–25,99	8,9–39,12	0,000005*
МТС не выявлены	50	17,20	12,70–21,50	3,38–36,50	0,0000001*
Контрольная группа	54	8,81	6,46–12,72	1,51–20,15	–

Примечание. n – число обследованных; * – отличия от контрольной группы; ** – отличия от группы НЭО без МТС.

ящем исследовании, не зависели от функциональной активности опухоли. Так, медианы концентрации белка у больных с карциноидным синдромом и без его признаков не показали статистически значимых различий между собой ($p = 0,16$), однако обе группы больных отличались от показателя маркера в контрольной группе ($p < 0,0000001$).

Следует также отметить, что нами не выявлено статистически значимой зависимости между уровнями ХгВ и возрастом пациентов, а также степенью злокачественности опухоли по шкале Grade.

Для оценки возможности применения ХгВ в качестве биохимического маркера НЭО нами проведен ROC-анализ результатов его определения в общей группе больных НЭО относительно контрольной группы. Как следует из рисунка, в результате анализа получен достаточно высокий показатель площади под кривой (Area Under Curve) – $AUC = 0,88$ (95% ДИ 0,83–0,929). Для выбора порогового уровня маркера была использована методика расчета максимального коэффициента Юдена $J_{max} = 0,657$, при котором порог составил 15,8 нг/мл. При полученном пороговом значении ХгВ специфичность в контрольной группе составила 96,3%, при этом диагностическая чувствительность в общей группе достигала 69,4%.

Далее была определена частота превышения рассчитанного порогового уровня (15,8 нг/мл) у обследованных пациентов с различными локализациями НЭО и в подгруппах, составленных по клинико-морфологическим признакам заболевания (табл. 2.)

Из всех локализаций наиболее высокая диагностическая чувствительность маркера была характерна для группы больных НЭО толстой кишки (75,0%). При НЭО поджелудочной железы повышенные уровни маркера выявляли у 71,2% больных. В то же время у больных НЭО желудка частота повышения ХгВ была ниже и составила 55,0%. В группе больных с различными локализациями НЭО значения маркера превышали пороговый уровень у большинства пациентов (75,0%). При анализе диагностической чувствительности в зависимости от распространенности процесса наиболее высокая чувствительность выявлена у больных с метастатическим поражением печени (75,0%) и лимфатических узлов (72,7%), тогда как при локализованных формах НЭО ХгВ был повышен у меньшего числа пациентов (63,3%). При дополнительном анализе с учетом результатов морфологического исследования наибольшая частота повышения ХгВ в сыворотке крови установлена для опухолей со степенью злокачественности Grade 2 и Grade 3 (72,0% и 70,0% соответственно), однако статистически значимых различий относительно группы НЭО Grade 1 получено не было (64,7%).

В целом, представленные нами результаты подтверждаются данными литературы других исследователей.

Первые работы, посвященные ХгВ, выполнены M. Stritsberg и соавт. [13,14] методом радиоиммунологического анализа (РИА), при этом обнаружено повышение в высоком проценте случаев не только ХгА, но и ХгВ у больных НЭО поджелудочной железы и других локализаций опухоли. Важным преимуществом ХгВ, на которое указывают разные авторы, является его независимость от таких факторов,

Таблица 2
Частота превышения порогового уровня ХгВ в различных группах НЭО

Группы обследованных		<i>n</i>	Частота повышения ХгВ
Общая группа НЭО		121	69,4%
По локализации	Желудок	20	55,0%
	Поджелудочная железа	74	71,2%
	Толстая кишка	12	75,0%
	Различные локализации	15	75,0%
По наличию карциноидного синдрома	КС +	36	63,9%
	КС –	85	71,8%
	МТС не выявлены	50	63,3%
По наличию метастазов	МТС в печени	60	75,0%
	МТС в лимфоузлах	11	72,7%
	Grade 1	17	64,7%
По степени злокачественности Grade	Grade 2	50	72,0%
	Grade 3	20	70,0%

как сопутствующие почечная и сердечно-сосудистая недостаточность, а также прием пациентами антисекреторных препаратов, которые могут влиять на секрецию ХгА, что осложняет интерпретацию результатов определения этого маркера [11–13, 15].

Исследование ХгВ, выполненное методом РИА у больных НЭО поджелудочной железы показало его достаточно высокую диагностическую эффективность, независимую от использования ингибиторов протонной помпы и возраста обследуемых пациентов [16]. По мнению авторов, ХгВ может использоваться в качестве дополнительного диагностического маркера опухолей этой локализации, что подтверждается также полученными нами данными о достаточно высокой диагностической чувствительности ХгВ при НЭО поджелудочной железы. Согласно сравнительному обзору, в последнее время отмечается повышенное внимание к комплексному исследованию гранинов, как одному из подходов к улучшению диагностической эффективности ХгА и ХгВ, благодаря их комплементарности [15].

Ретроспективное исследование свидетельствует о целесообразности в дальнейшем исследовать ХгВ в комплексе с ХгА для получения оптимальных диагностических пороговых уровней в целях повышения точности диагностики НЭО [17].

Таким образом, за последние два десятилетия в мировой литературе накоплены данные о возможности совместного применения ХгВ и ХгА при НЭО различных локализаций [13, 15, 16], что также является одной из задач дальнейших исследований на больших выборках больных НЭО.

Заключение. Проведенное нами исследование показало значимость ХгВ как потенциального биохимического маркера НЭО альтернативного ХгА у больных НЭО различных локализаций. В перспективе целесоо-

бразно провести комплексное сравнительное исследование белков семейства гранинов в целях повышения эффективности выявления опухолей нейроэндокринной природы, а также их биохимического мониторинга на фоне проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8, 10-17 см. REFERENCES)

- Любимова Н.В., Томс М.Г., Чурикова Т.К., Харитиди Т.Ю. Клиническое значение хромогранина А при нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта. *Альманах клинической медицины*. 2015; 41:35–9.

REFERENCES

- Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr. Relat. Cancer*. 2011; 18(1):17–25.
- Aluri V., Dillon J.S. Biochemical testing in neuroendocrine tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2017; 46(3):669–77.
- Vinik A.I., Silva M.P., Woltering E.A. et al. Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2009; 38(8):876–89.
- Hofland J., Kallias G., de Herder W.W. Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr. Rev.* 2020; 41(2):371–403.
- Cheng Y., Sun Z., Bai C., Yan X., Qin R., Meng C., Ying H. Serum chromogranin A levels for the diagnosis and follow-up of well-differentiated non-functioning neuroendocrine tumors. *Tumour Biol*. 2016; 37(3):2863–9.
- Jun E., Kim S.C., Song K.B., Hwang D.W., Lee J.H., Shin S.H., Hong S.M., Park K.M., Lee Y.J. Diagnostic value of chromogranin A in pancreatic neuroendocrine tumors depends on tumor size: A prospective observational study from a single institute. *Surgery*. 2017; 162(1):120–30.
- Corti A., Marcucci F., Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*. 2018; 470(1):199–210.
- Ma Z.Y., Gong Y.F., Zhuang H.K., Zhou Z.X., Huang S.Z., Zou Y.P. et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: a review of serum biomarkers, staging, and management. *World J. Gastroenterol*. 2020; 26(19):2305–22.
- Lyubimova N.V., Toms M.G., Churikova T.K., Kharitidi T.Yu. Clinical significance of chromogranin A in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Альманах клинической медицины*. 2015; 41:35–9. (in Russian)
- Laguette F., Anouar Y., Montero-Hadjadje M. Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway. *IUBMB Life*. 2020; 72(4):524–32.
- Pulvirenti A., Rao D., McIntyre C.A., Gonen M., Tang L.H., Klimstra D.S., Fleisher M., Ramanathan L.V., Reidy-Lagunes D., Allen P.J. Limited role of Chromogranin A as clinical biomarker for pancreatic neuroendocrine tumors. *HPB (Oxford)*. 2019; 21(5):612–8.
- Campana D., Nori F., Piscitelli L., Morselli-Labate A.M., Pezzilli R., Corinaldesi R., Tomassetti P. Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *J. Clin. Oncol*. 2007; 25(15):1967–73.
- Stridsberg M., Eriksson B., Fellström B., Kristiansson G., Tiensuu Janson E. Measurement of chromogranin B can serve as a complement to chromogranin A. *Regulatory Peptides*. 2007; 193:80–3.
- Stridsberg M., Oberg K., Li Q., Engström U., Lundqvist G. Measurement of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J. Endocrinol*. 1995; 144(1):49–59.
- Bech P.R., Martin N.M., Ramachandran R., Bloom S.R. The biochemical utility of chromogranin A, chromogranin B and cocaine – and amphetamine-regulated transcript for neuroendocrine neoplasia. *Ann. Clin. Biochem*. 2014; 51(1):8–21.
- Miki M., Ito T., Hijioka M., Lee L., Yasunaga K., Ueda K., Fujiyama T., Tachibana Y., Kawabe K., Jensen R.T., Ogawa Y. Utility of chromogranin B as a biomarker in Japanese patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol*. 2017; 47(6):520–8.
- Monaghan P.J., Lamarca A., Valle J.W., Hubner R.A., Mansoor W., Trainer P.J., Darby D. Routine measurement of plasma chromogranin B has limited clinical utility in the management of patients with neuroendocrine tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2016; 84(3):348–52.

© АВЕРЬЯНОВА И.В., 2022

Аверьянова И.В.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ КОМПОНЕНТОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ЖИТЕЛЕЙ-СЕВЕРЯН

ФГБУН Научно-исследовательский центр «Арктика» Дальневосточного отделения РАН, 685000, г. Магадан, Россия

Глобальная распространенность метаболического синдрома растет ежедневно, так в настоящее время в различных регионах мира выявлена значимая тенденция к росту распространенности метаболического синдрома, что в современных условиях приобретает характер эпидемии. До настоящего времени на территории Магаданской области не проводились работы по изучению распространенности и частоты встречаемости компонентов метаболического синдрома у жителей-северян. Исходя из чего, данное исследование направлено на определение распространенности основных и дополнительных компонентов метаболического синдрома среди жителей Северного региона (в возрасте от 17 до 74 лет). В исследованиях приняли участие 240 уроженцев из числа европеоидов: юноши, мужчины трудоспособного и пенсионного возраста, проживающие на территории Магаданской области. В работе использовали фотометрические, иммунохемилюминесцентные методы исследования, а также стандартные методы оценки индекса массы тела и сердечно-сосудистой системы. Факторы метаболического синдрома были определены в соответствии с критериями Национальной образовательной программой по холестерину (NCEP), группы по лечению взрослых III (АТФ III), Международной федерации диабета (IDF) и Консенсуса международных экспертов в областях кардиологии и эндокринологии.

Проведен анализ частоты встречаемости пяти основных (избыточной массы тела, нарушения углеводного обмена, артериальной гипертензии, гипертриглицеридемии, гипоальфахолестеринемии) и трех дополнительных (наличие инсулинорезистентности, нарушение пуринового обмена и дефицитная и недостаточная концентрация витамина D) компонентов метаболического синдрома, а также их сочетаний в различных возрастных группах уроженцев Севера. Согласно критериям АТФ III, NCEP и IDF, распространенность встречаемости метаболического синдрома была выше среди лиц пожилого возраста и составила 47% по сравнению с лицами трудоспособного возраста (21%) и относительно группы юношей (3%). Выявлена более высокая частота распространения как основных, так и дополнительных факторов метаболического синдрома в группах лиц пожилого возраста. Суммарный индекс встречаемости факторов метаболического синдрома в группе юношей составил 101%; в группе мужчин трудоспособного возраста – 180%, а у мужчин пенсионного возраста – 274%. Полученные данные о распространенности и частоте встречаемости компонентов метаболического синдрома в различных возрастных группах уроженцев Севера могут быть использованы в качестве информационной базы, что позволит на научной основе планировать и, в дальнейшем проводить целенаправленные профилактические мероприятия, что, в конечном счете, позволит улучшить качество и продолжительность жизни жителей-северян.

Ключевые слова: уроженцы Севера; основные компоненты метаболического синдрома; дополнительные компоненты метаболического синдрома.

Для цитирования: Аверьянова И.В. Распространенность и частота встречаемости компонентов метаболического синдрома у жителей-северян. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 444-450. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-444-450>

Для корреспонденции: Аверьянова Инесса Владиславовна, д-р биол. наук, зав. лаб., вед. науч. сотр. лаб. физиологии экстремальных состояний; e-mail: Inessa1382@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.03.2022

Принята к печати 15.04.2022

Опубликовано 00.08.2022

Averyanova I. V.

OCCURRENCE OF METABOLIC SYNDROME COMPONENTS IN NORTHERNERS

Scientific Research Center «Arktika», Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 685000, Magadan, Russia

The metabolic syndrome is currently becoming more common. It is a significant public health concern as it is epidemic affecting populations in many regions of the world. In Magadan region no research has been carried out to study the frequency of components of the metabolic syndrome among northerners. This survey was performed to assess the occurrence of the main and additional components of the metabolic syndrome among 17 to 74 year old residents of the Northern region. Two hundred and forty north born Caucasians participated in the study: male subjects at their young age, working age, and retirement age, all belonging to the territory of Magadan region. We used photometric, immunochemiluminescent research methods, as well as standard methods for assessing body mass index and cardiovascular system. The metabolic syndrome factors were determined in accordance with the criteria of the National Cholesterol Education Program (NCEP), the Adult Treatment Program III (ATP III), the International Diabetes Federation (IDF), and the Consensus of International Experts in Cardiology and Endocrinology. We analyzed five main components of the metabolic syndrome (overweight, carbohydrate metabolic impairments hypertension, hypertriglyceridemia, hypoalphacholesterolemia) and three additional components (presence of insulin resistance, purine metabolism disorder, deficient and insufficient concentrations of vitamin D). Combinations of the components were also studied through the examined age groups. According to the ATP III, NCEP and IDF criteria, the metabolic syndrome was more common in elderly subjects (47%) than in working age (21%) or young examinees (3%). Older males tended to exhibit higher frequency of both the main and additional factors of metabolic syndrome. The total index of the occurrence of metabolic syndrome factors in the group of young men was 101%; in the group of men of working age – 180%, and in men of retirement age – 274%.

The results on occurrence of the metabolic syndrome components observed in the surveyed groups of northerners can make an information data base, which we assume can be applied when planning and carrying out scientifically grounded preventive measures, which will improve subjective quality of life and its expectancy under the North conditions.

Key words: north born population; main components of the metabolic syndrome; additional components of the metabolic syndrome.

For citation: Averyanova I. V. Occurrence of metabolic syndrome components in northerners. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 444-450 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-444-450>

For correspondence: Averyanova Inessa Vladislavovna, Biological Doctor, Head Researcher, Leading Researcher, Laboratory for Physiology of Extreme States; e-mail: Inessa1382@mail.ru

Information about author:

Averyanova I.V., <http://orcid.org/0000-0002-4511-6782>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship

Received 18.03.2022

Accepted 15.04.2022

Published 00.08.2022

Введение. Метаболический синдром – это совокупность множества кардиометаболических факторов риска, включающая в себя центральное ожирение, повышенное артериальное давление, повышенный уровень глюкозы натощак и дислипидемию, при этом возникновение метаболического синдрома является условием высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1]. Также указывается на то, что тяжесть коронавирусной инфекции (COVID-19) усиливается при наличии метаболического синдрома [2]. Глобальная распространенность метаболического синдрома растет почти ежедневно, так в настоящее время в различных регионах мира выявлена значимая тенденция к росту распространенности метаболического синдрома, что в современных условиях приобретает характер эпидемии [3], что связывают с быстрой урбанизацией, чрезмерным потреблением энергии, развитием ожирения и малоподвижным образом жизни [4]. Прогнозы неутешительно показывают, что к 2025 г. число лиц с метаболическим синдромом может достигнуть 500 млн. человек [5]. Метаболический синдром увеличивает риск сахарного диабета 2 типа (СД2), сердечно-сосудистых заболеваний, инфаркта миокарда, инсульта и удваивает риск смертности от такого события [6].

Необходимо отметить, что на территории Магаданской области до настоящего времени не проводились работы по изучению распространенности и частоты встречаемости компонентов метаболического синдрома у жителей-северян.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы явилось выявление факторов риска развития метаболического синдрома и его вариантов в популяции жителей Севера в ряду от лиц юношеского возраста к группе лиц пожилого возраста.

Материал и методы. Для поставленной цели в рамках реализации программы научного мониторинга жителей-северян «Арктика. Человек. Адаптация», проводимой на базе НИЦ «Арктика» ДВО РАН (г. Магадан) было проведено комплексное обследование 240 представителей мужского пола – уроженцев Северных территорий. В исследованиях приняли участие 147 юношей из числа европеоидов (средний возраст которых составил $18,8 \pm 0,7$ лет), характеризующихся следующими антропометрическими показателями: длина тела – $178,9 \pm 0,5$ см, масса тела $70,5 \pm 0,6$ кг, индекс массы тела – $21,9 \pm 0,2$ кг/м². Также были обследованы 55 мужчин трудоспособного

возраста ($36,8 \pm 0,8$ лет) из числа европеоидов, проживающих на территории Магаданской области, средние соматометрические показатели которых имели следующие числовые величины: длина тела составила $180,5 \pm 0,9$ см, масса тела была равна $84,1 \pm 1,1$ кг и индекс массы тела (ИМТ) был равен $25,8 \pm 0,5$ кг/м². Помимо вышеописанных групп, в исследованиях участвовали 38 мужчин пожилого возраста ($66,6 \pm 1,1$ лет) у которых масса тела составила $83,9 \pm 1,4$ кг, длина тела – $173,3 \pm 0,9$ см, а ИМТ равнялся $27,9 \pm 0,4$ кг/м².

У обследуемых определяли основные показатели физического развития: длину тела с точностью до 0,5 см с помощью настенного ростомера, массу тела измеряли с точностью до 0,1 кг с использованием медицинских весов. Из полученных антропометрических характеристик рассчитывали индекс массы тела (ИМТ, кг/м²). Артериальное давление – систолическое (САД, мм рт.ст.) и диастолическое (ДАД, мм рт.ст.) регистрировали на плечевой артерии в состоянии покоя (сидя) с использованием автоматического тонометра Nesei DS-1862 (Япония).

Содержание триглицеридов (ТГ, ммоль/л), холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП, ммоль/л) определяли колориметрическим фотометрическим методом с использованием АУ 680 (Beckman Coulter, США). Анализ глюкозы натощак определяли гексокиназным методом на биохимическом анализаторе АУ 680 (Beckman Coulter, США). Исследование 25(ОН) витамина D в сыворотке крови выполняли на автоматическом иммунохимическом анализаторе Unicel DxI 800 (Beckman Coulter, США) с использованием технологии ACCESS-ИФА. Инсулин определяли с использованием иммунохимического анализатора «IMMULITE 2000XPI» (Siemens, США) с использованием метода ферментативно-усиленной хемилюминесценции. Оценка инсулинорезистентности производилась на основе предложенной D.R. Matthews и соавт. [7] формуле для расчета:

Индекс HOMA-IR: $[\text{Инсулин (мкМг/мл)} \times \text{Глюкоза (ммоль/л)}] / 22,5$.

Определение мочевого кислоты проводилось колориметрическим ферментативным уриказным методом с использованием АУ 680 (Beckman Coulter, США).

Критерии включения в группу с метаболическим синдромом были определены исходя из положений Национальной образовательной программой по холестерину (NCEP) [8], Группы по лечению взрослых III (АТР III) [9] и критериев Международной федерации диабета (IDF) [10],

а также критериев Консенсуса международных экспертов в областях кардиологии и эндокринологии [6].

Так, при выявлении у обследуемых концентрации глюкозы натощак более 5,5 ммоль/л определяли нарушение углеводного обмена. При концентрации триглицеридов (ТГ), превышающей значения 1,7 ммоль/л, устанавливали гипертриглицеридемию. При уровне холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) менее 1,03 ммоль/л фиксировали наличие гипоальфахолестеринемии. При величинах систолического артериального давления (САД) ≥ 130 мм рт.ст. и/или диастолического артериального давления (ДАД) ≥ 85 мм рт.ст. определяли артериальную гипертензию. Для определения избыточной массы тела руководствовались критериями Экспертов американской ассоциации клинических эндокринологов [11] при индексе массы тела ИМТ более 25 кг/м², а также заключением Международной федерации диабета (IDF) о соответствии пограничной величины окружности талии к значению индекса ИМТ, равному 25 кг/м² [10]. В качестве дополнительных факторов метаболического синдрома анализировали концентрацию мочевого кислоты, где при значениях более 400 мкмоль/л регистрировали нарушение пуринового обмена [12]. Для определения недостаточного и дефицитного уровней концентрации 25(ОН) витамина D использовали пороговые значения в соответствии с критериями Клинических рекомендаций Российской ассоциации эндокринологов (2016), где оптимальным уровнем считалась концентрация 30-100 нг/мл (75-250 нмоль/л), недостаточность определялась при уровне, варьирующем от 20 до 30 нг/мл (от 50 до 75 нмоль/л) и дефицит определялся при концентрации менее 20 нг/мл (менее 50 нмоль/л) [13]. Выявление инсулинорезистентности проводили с помощью метода оценки гомеостатической модели (НОМА-IR) с точкой отсечения $> 2,50$ усл. ед. [14].

Исследование было выполнено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации (2013) [15]. Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУН ИБПС ДВО РАН (№001/019 от 29.03.2019 г.). У всех обследуемых было получено письменное информированное согласие для включения в исследование.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с применением пакета прикладных программ «Statistica 7.0». Проверка на нормальность распределения измеренных переменных осуществлялась на основе теста Шапиро–Уилка. Все показатели отклонений измерялись в процентах от физиологической нормы или общепринятых референсных значений с расчетом ошибки средней для доли. Статистическая значимость различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости (p) в работе принимался равным 0.05; 0.01; 0.001 [16].

Результаты. В таблице представлены результаты частоты встречаемости основных и дополнительных компонентов метаболического синдрома у юношей, мужчин трудоспособного и пожилого возраста. Для определения доли лиц с избыточной массой тела была проведена дифференциация обследованных лиц по величинам индекса массы тела, которая показала, что в группе юношей дефицит массы тела был зафиксирован в 11 % случаев, а доля лиц с ожирением I степени составила лишь 1%, нормальная масса тела в группе юношей была у 79% обследуемых, а избыточная масса тела была у 9% обследуемых.

Частота встречаемости ожирения I степени в группе мужчин трудоспособного возраста возрастала до 17%, нормальная масса тела в группе мужчин была выявлена лишь у 36% обследуемых, при этом в исследуемой выборке мужчин трудоспособного возраста отсутствуют лица, характеризующиеся дефицитом массы тела на фоне увеличения доли лиц с избыточной массой тела до 47%. В группе мужчин пожилого возраста на фоне более высоких величин ИМТ ($27,9 \pm 0,4$ кг/м²) избыточная масса тела была характерна 58%, ожирение I степени было выявлено у 25% обследуемых, а нормальная масса тела была отмечена у 17% мужчин пожилого возраста. Исходя из чего избыточная масса тела (ИМТ > 25 кг/м²) была характерна $10 \pm 2\%$ юношеской группы, $64 \pm 6\%$ мужчин среднего возраста с увеличением к группе лиц пожилого возраста до $83 \pm 6\%$. Гипертриглицеридемия в группе юношей была выявлена у $5 \pm 2\%$, у мужчин среднего возраста у $24 \pm 5\%$ и у $35 \pm 7\%$ обследуемых мужчин

Частота встречаемости основных и дополнительных компонентов метаболического синдрома у юношей, мужчин трудоспособного и пожилого возраста

Компоненты метаболического синдрома	Юноши, $n=147$	Мужчины трудоспособного возраста, $n=55$	Мужчины пожилого возраста, $n=38$	Уровень значимости различий между юношами и представителями пожилого возраста
Основные компоненты метаболического синдрома				
Избыточная масса тела	$10 \pm 2\%$	$64 \pm 6\%$	$83 \pm 6\%$	$p < 0,001$
Артериальная гипертензия по САД	$32 \pm 3\%$	$14 \pm 4\%$	$61 \pm 7\%$	$p < 0,001$
Артериальная гипертензия по ДАД	$17 \pm 3\%$	$44 \pm 6\%$	$47 \pm 7\%$	$p < 0,001$
Нарушения углеводного обмена	$29 \pm 4\%$	$30 \pm 6\%$	$43 \pm 7\%$	$p < 0,05$
Гипертриглицеридемия	$5 \pm 2\%$	$24 \pm 5\%$	$35 \pm 7\%$	$p < 0,001$
Гипоальфахолестеринемия	$8 \pm 2\%$	$4 \pm 3\%$	$5 \pm 3\%$	$p = 0,41$
Дополнительные компоненты метаболического синдрома				
Нарушения пуринового обмена	Нет данных	$15 \pm 4\%$	$16 \pm 5\%$	
Инсулинорезистентность	$13 \pm 3\%$	$49 \pm 6\%$	$50 \pm 7\%$	$p < 0,001$
Дефицит витамина D	Нет данных	$76 \pm 5\%$	$76 \pm 6\%$	

пожилого возраста. Гипоальфахолестеринемия была характерна $8\pm 2\%$ юношей, $4\pm 3\%$ мужчин среднего возраста и $5\pm 3\%$ мужчин пенсионного возраста с отсутствием значимых различий в исследуемых группах. Анализ дополнительных компонентов метаболического синдрома показал, что нарушение пуринового обмена было выявлено у $15\pm 4\%$ мужчин трудоспособного возраста и у $16\pm 5\%$ мужчин пожилого возраста. Инсулинорезистентность была характерна $13\pm 3\%$ обследуемых их числа представителей юношеского периода онтогенеза и $49\pm 6\%$ и $50\pm 7\%$ мужчин трудоспособного и пенсионного возраста соответственно. Недостаточная и дефицитная концентрация витамина D была выявлена у 76% как представителей мужчин среднего возраста, так и группы мужчин пенсионного возраста. Распространенность метаболического синдрома в группе юношей составила 3% . Среди мужчин трудоспособного возраста метаболический синдром выявлялся чаще, чем среди юношей (21% с увеличением частоты встречаемости в группе представителей пожилого возраста (47%)).

Обсуждение. Полученные данные указывают на то, что в возрастном аспекте наблюдается увеличение доли лиц, для которых характерно наличие как основных, так и дополнительных факторов метаболического синдрома. Так, показано, что $64\pm 6\%$ обследуемых мужчин трудоспособного возраста имеют избыточную массы тела, что на значимую величину выше, относительно группы юношей ($p<0,001$), и, соответственно значимо ниже, чем в группе мужчин пожилого возраста ($p<0,05$), в которой уже 83% характеризовались ИМТ, превышающим нормативный диапазон. Полученные нами результаты в полной мере согласуются с исследованиями других авторов, где указывается на то, что в онтогенезе происходит закономерное увеличение частоты встречаемости общего и висцерального ожирения, при этом данные изменения имеют прямую зависимость от возраста [17].

Уровень артериального давления относится к основным индикаторам функционального состояния сердечно-сосудистой системы, при этом поддержание оптимальной величины артериального давления обеспечивается достаточно сложной морфофизиологической системой, включающей совокупность нейрогуморальных процессов и соматометрических структур, объединенных сетью взаимосвязей [18]. В нашем исследовании показано, что, уже начиная с юношеского периода онтогенеза, отмечается достаточная степень напряжения в работе сердечно-сосудистой системы, что проявляется значительным процентом доли лиц с ВНАД и артериальной гипертензией по систолическому артериальному давлению равная $32\pm 3\%$, со значимым снижением процента встречаемости у группы мужчин трудоспособного возраста ($14\pm 4\%$, $p<0,001$) и с выраженным увеличением в выборке представителей пожилого возраста, до $61,7\pm 3\%$ ($p<0,001$). Такие особенности наблюдались на фоне значимо более низкого процента встречаемости ВНАД и артериальной гипертензии по диастолическому артериальному давлению у юношей нашего региона с величиной равной $17\pm 3\%$, с возрастанием у мужчин трудоспособного возраста до $44\pm 6\%$ ($p<0,001$) и у мужчин пожилого возраста до $47\pm 7\%$ ($p<0,001$).

Исходя из полученных данных, сумма частот встречаемости лиц с высоким нормальным артериальным давлением и артериальной гипертензией I степени, как по САД, так и по ДАД, была нами расценена как степень напряжения в деятельности сердечно-сосудистой

системы и составила в группе юношей – 49% , у мужчин трудоспособного возраста – 58% и у обследованной выборке мужчин пенсионного возраста – 108% .

Известно, что основным показателем углеводного обмена является уровень глюкозы в крови натощак, при этом превышение нормогликемического порога является причиной развития сахарного диабета 2-го типа, является основным фактором риска ишемической болезни сердца (ИБС), слепоты, почечной недостаточности и всех видов рака [19]. Как показывают результаты нашего исследования, частота встречаемости повышенного уровня глюкозы в группе юношей составила $29\pm 2\%$, с отсутствием значимых отличий относительно группы представителей трудоспособного возраста, у которых доля лиц с гипергликемией равнялась $30\pm 6\%$ ($p=0,88$) с возрастающей долей лиц до $43\pm 7\%$ ($p<0,05$) в выборке мужчин пожилого возраста.

Известно, что холестерин липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) обычно используются в качестве достаточного информативного биомаркера риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [20]. Показано, что снижение концентрации ЛПВП ниже нормативного диапазона связано с инсулинорезистентностью и сахарным диабетом 2-го типа [21]. Помимо этого оптимальный уровень ЛПВП также имеет различные положительные эффекты, такие как антиоксидантная, антиагрегантная и антикоагулянтная функция [22], все это способствует профилактическому эффекту в отношении сердечно-сосудистых заболеваний. В группе юношей распространенность пониженного холестерина ЛПВП в плазме натощак составила $8\pm 2\%$, с отсутствием значимых различий относительно группы мужчин трудоспособного и пенсионного возраста, у которых гипоальфахолестеринемия была выявлена в $4\pm 3\%$ ($p=0,27$) и $5\pm 3\%$ случаев ($p=0,40$), соответственно.

Показано, что уровень триглицеридов, превышающий нормативный диапазон, является маркером риска развития диабета у здоровых мужчин и является компонентом «порочного метаболического круга» [23], так как связан с повышением уровня свободных жирных кислот, обуславливающих снижение чувствительности к инсулину [24], в то время как низкие величины триглицеридов, напротив, снижают риск развития данных проявлений [23]. Степень возрастания гипертриглицеридемии имела возрастзависимую ассоциацию, так в группе юношей доля лиц с превышением уровня ТГ относительно нормативного диапазона составила $5\pm 2\%$ со значимым увеличением к группам представителей мужчин трудоспособного возраста ($24\pm 5\%$, $p<0,001$) и пенсионного возраста ($35\pm 7\%$, $p<0,001$).

НОМА-IR представляет собой индекс, отражающий взаимосвязь между секрецией инсулина поджелудочной железой и способностью поддерживать оптимальный уровень гликемии [25] и в настоящее время рассматривается как один из действенных маркеров, используемых для оценки инсулинорезистентности [26]. Известно, что состояние инсулинорезистентности, помимо возникновения сахарного диабета 2-го типа также обуславливает ожирение, артериальную гипертензию, дислипидемию и атеросклероз [27]. Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время доминирующей является точка зрения, согласно которой в основе развития метаболического синдрома лежит феномен инсулинорезистентности периферических тканей, тесно ассоциированной с избыточной массой тела [28]. Результаты нашего ис-

следования показали, что индекс НОМА превышал значения нормы у $13 \pm 3\%$ обследуемых из числа юношей, у $49 \pm 6\%$ у мужчин трудоспособного возраста и у $50 \pm 7\%$ мужчин пожилого возраста. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие значимых различий между представителями трудоспособного и пожилого возраста по количеству лиц, которым свойственно нарушение углеводного обмена (гипергликемия), в группе трудоспособного возраста отмечается увеличение доли лиц с признаками инсулинорезистентности. Полученные в нашем исследовании результаты в полной мере согласуются с данными других исследователей, которые феномен инсулинорезистентности описывают как пониженную чувствительность и реактивность клеток-мишеней к действию инсулина при его достаточной концентрации, приводящую к снижению одного или нескольких биологических эффектов этого гормона, при этом наличие нарушения углеводного обмена является не обязательным [29]. В данном случае идет речь о так называемой латентной инсулинорезистентности, при которой на фоне отсутствия гипергликемии наблюдаются дислипидемические сдвиги и избыточная (или даже нормальная) масса тела [30].

Сывороточная мочевая кислота является конечным продуктом метаболизма пуринов у людей [31]. Высокая сывороточная мочевая кислота или гиперурикемия считаются маркером воспаления и связана с неблагоприятными исходами при сердечной недостаточности [32]. Хотя мочевая кислота и не входит в определение метаболического синдрома, но несколько исследований показали положительную корреляцию между ними [33]. Необходимо отметить, что бессимптомная гиперурикемия широко распространена в популяции, в том числе среди жителей нашей страны и вносит существенный вклад в общий сердечно-сосудистый риск [34]. Результаты исследования показали, что нарушение пуринового обмена было выявлено у $15 \pm 4\%$ мужчин трудоспособного возраста и у $16 \pm 5\%$ мужчин пожилого возраста. При этом необходимо указать на то, что выявленная в нашем исследовании доля лиц с гиперурикемией значительно ниже, чем указывается в исследованиях групп лиц пожилого возраста, где она составила $27,6\%$ [35].

Дефицит витамина D является проблемой общественного здравоохранения, поскольку он носит пандемический характер [36]. Согласно результатам исследования, недостаточный и дефицитный уровни витамина D, также могут увеличивать риск возникновения метаболического синдрома [37,38]. Показано, что уровень $25(\text{OH})\text{D}$ в сыворотке крови был обратно связан с риском абдоминального ожирения, артериальной гипертензией и аномальным гомеостазом глюкозы [39], а также риском развития резистентности к инсулину [40]. Учитывая плейотропное действие витамина D, было высказано предположение, что он может способствовать развитию благоприятного метаболического профиля, именно с этой позиции, сывороточную концентрацию $25\text{-гидроксиколекальциферола}$ [$25(\text{OH})\text{D}$] – основного маркера статуса витамина D – в настоящее время рассматривают как альтернативный биомаркер метаболического здоровья [41]. Результаты нашего исследования демонстрируют достаточно высокий процент недостаточной и дефицитной концентрации витамина D, которая была зафиксирована у 76% как представителей мужчин трудоспособного возраста, так и группы мужчин пенсионного возраста.

Исходя из критериев Национальной образовательной программой по холестерину (NCEP), группы по лечению взрослых III (АТР III), Международной федерации диабета (IDF) и Консенсуса международных экспертов в областях кардиологии и эндокринологии предварительное определение метаболического синдрома основано на присутствии 3 и более факторов. Сравнивая распространенность метаболического синдрома среди группы юношей, мужчин среднего возраста и мужчин пожилого возраста следует указать на то, что распространенность метаболического синдрома в выборке лиц пожилого возраста почти в 15,5 раза выше, чем в группе юношей, которая составила 47% против 3% ($p < 0,001$) соответственно.

Ранжирование степеней отклонения анализируемых показателей от нормативных диапазонов позволило сформировать формулы для 3-х групп, начиная с наибольшего процента встречаемости в выборке с одновременным расчетом специального индекса – суммарного индекса встречаемости факторов метаболического синдрома (по сумме отклонения в процентах пяти показателей от референса). В целом, встречаемость «фенотипических» вариантов основных компонентов метаболического синдрома представлена следующими формулами:

Для юношей: $\uparrow \text{САД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{МТ} > \downarrow \text{ЛПВП} > \uparrow \text{ТГ}$, где суммарный индекс встречаемости факторов метаболического синдрома составила 101% ;

Для мужчин среднего возраста: $\uparrow \text{МТ} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ТГ} > \uparrow \text{САД} > \downarrow \text{ЛПВП}$ с суммарным индексом встречаемости факторов метаболического синдрома равным 180% ;

Для мужчин пожилого возраста: $\uparrow \text{МТ} > \uparrow \text{САД} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ТГ} > \downarrow \text{ЛПВП}$, где суммарный индекс встречаемости факторов метаболического синдрома составил 274% .

Из представленных формул видно, что в группе юношей, с большой частотой встречается фактор ВНАД и артериальной гипертензии по САД, что свидетельствует о раннем дебюте напряжения в работе сердечно-сосудистой системы уже в молодом возрасте. На втором месте в структуре формулы для юношей с достаточным удельным весом (29%) оказался фактор нарушения углеводного обмена. Фактор ВНАД и артериальной гипертензии по диастолическому артериальному давлению расположился на третьем месте в структуре формулы. На 4-м месте оказался компонент избыточной массы тела, а на 5-м и 6-м месте – факторы гипоальфахолестеринемии и гипертриглицеридемии, соответственно.

При анализе абсолютного вклада основных компонентов метаболического синдрома было показано, что у исследуемых мужчин-северян трудоспособного и пожилого возраста доминирующим компонентом структуры оказалась избыточная масса тела, которая встречалась в подавляющем числе случаев. В группе мужчин трудоспособного возраста в структуре распределения факторов на втором месте оказался компонент ВНАД и артериальной гипертензии по диастолическому артериальному давлению, на 3-м месте – нарушение углеводного обмена. На 4-м месте находился фактор выявленной гипертриглицеридемии, тогда как в группе юношей данный фактор находился на последнем месте в структуре. С последующим включением в структуру фактора ВНАД и артериальной гипертензии по систолическому артериальному давлению, который,

сместился из превалирующего компонента в структуре формулы юношей, на 5-е место в группе мужчин трудоспособного возраста. Наименьший вклад в структуру распределения основных факторов метаболического синдрома у мужчин трудоспособного возраста был характерен для гипоальфахолестеринемии.

В группе мужчин пожилого возраста после превалирующего вклада избыточной массы тела в структуру формулы на 2-м и 3-м месте находились компоненты напряжения сердечно-сосудистой системы: ВНАД и артериальная гипертензия по систолическому и диастолическому артериальному давлению соответственно. На 4-м месте находился фактор нарушения углеводного обмена, а на 5-м и 6-м месте факторы гипертриглицеридемии и гипоальфахолестеринемии.

Расчет суммарного индекса встречаемости факторов метаболического синдрома показал значительное его возрастание в ряду от группы юношей к лицам пожилого возраста, где у юношей он составил 101%; в группе мужчин трудоспособного возраста – 180%, а у мужчин пожилого возраста – 274%.

Заключение. Таким образом, проведенный анализ частоты встречаемости пяти основных (избыточной массы тела, нарушения углеводного обмена, артериальной гипертензии, гипертриглицеридемии, гипоальфахолестеринемии) и трех дополнительных (наличие инсулинорезистентности, нарушение пуринового обмена и дефицитная и недостаточная концентрация витамина D) компонентов метаболического синдрома, а также их сочетаний в различных возрастных группах уроженцев Севера выявил более высокую частоту в группах лиц пожилого возраста, за исключением гипоальфахолестеринемии. При этом распространенность метаболического синдрома в выборке лиц пожилого возраста почти в 15,5 раза была выше, чем в группе юношей, которая составила 47% против 3% ($p < 0,001$) соответственно. Среди мужчин среднего возраста метаболический синдром был отмечен у 21% обследуемых.

Распределение встречаемости основных компонентов метаболического синдрома в структуре формул различалось в зависимости от возрастной группы и имело следующий вид: для юношей – $\uparrow \text{САД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{МТ} > \downarrow \text{ЛПВП} > \uparrow \text{ТГ}$; для мужчин трудоспособного возраста – $\uparrow \text{МТ} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ТГ} > \uparrow \text{САД} > \downarrow \text{ЛПВП}$ и для мужчин пенсионного возраста – $\uparrow \text{МТ} > \uparrow \text{САД} > \uparrow \text{ДАД} > \uparrow \text{ГЛЮ} > \uparrow \text{ТГ} > \downarrow \text{ЛПВП}$. Проведенный анализ основных и дополнительных компонентов метаболического синдрома в группе юношей позволил выявить преобладание ВНАД и артериальной гипертензии по САД, а у мужчин трудоспособного и пенсионного возраста максимальную частоту избыточной массы тела в анализируемых выборках. При этом в ряду от группы юношей к лицам пожилого возраста выявлено значительное возрастание индекса встречаемости факторов метаболического синдрома, величина которого в группе представителей юношеского периода онтогенеза составила 101%; в группе мужчин трудоспособного возраста – 180%, а у мужчин пожилого возраста – 274%.

Впервые полученные данные о распространенности и частоте встречаемости компонентов метаболического синдрома в различных возрастных группах уроженцев Севера могут быть использованы в качестве информационной базы, что позволит на научной основе планировать и, в дальнейшем, проводить целенаправленные профилактические мероприятия.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 12, 14–15, 17, 19–28, 31–33, 35–41 см. REFERENCES)

13. Пигарова Е.А. Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е., Дзеранова Л.К., Каронова Т.Л., Ильин А.В., Мельниченко Г.А., Дедов И.И. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике, лечению и профилактике дефицита витамина D у взрослых. *Проблемы эндокринологии*. 2016;4: 60-1. DOI:10.14341/probl201662460-84.
16. Боровиков В.П. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов (2-е издание). СПб: Питер; 2003. DOI:10.1007/978-3-642-60946-6_108.
18. Кобалава Ж.Д., Колесник Э.Л., Троицкая Е.А. Современные европейские рекомендации по артериальной гипертензии: обновленные позиции и нерешенные вопросы. *Клиническая фармакология и терапия*. 2019; 28 (2):7-18.
29. Клебанова Е.М., Балаболкин М.И., Кремникова В.М. Значение жировой ткани и её гормонов в механизмах инсулиновой резистентности и развития сахарного диабета 2-го типа. *Клиническая медицина*. 2007;7:20-7.
30. Гинзбург М.М., Козупица Г.С. Синдром инсулинорезистентности. *Проблемы эндокринологии*. 1997; 1: 40-3.
34. Кобалава Ж.Д., Троицкая Е.А. Бессимптомная гиперурикемия и риск развития сердечно-сосудистых и почечных заболеваний. *Кардиология*. 2020; 60(10): 113-21. DOI: 10.18087/cardio.2020.10.n1153.

REFERENCES

1. Gami A.S., Witt B.J., Howard D.E., Erwin P.J., Gami L.A., Somers, V.K. et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 49:403-14. DOI:10.1016/j.jacc.2006.09.032.
2. Yanai H. Metabolic syndrome and COVID-19. *Cardiol Res.* 2020; 11: 360-5. DOI:10.14740/cr1181.
3. O'Neill S., O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes. Rev.* 2015; 16:1-12, <https://doi.org/10.1111/obr.12229>.
4. Kaur J.A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014; 2014:1-21. DOI:10.1155/2014/943162.
5. Fonseca M.J., Gaio R., Lopes C., Santos A.C. Association between dietary patterns and metabolic syndrome in a sample of Portuguese adults. *Nutr. J.* 2012; 11: 64. DOI:10.1186/1475-2891-11-64.
6. Alberti K.G.M.M., Eckel R.H., Grundy S.M. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome/ A Joint Interim statement of the International Diabetes Federation taskforce on epidemiology and prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 120:1640-5. DOI:10.1161/circulationaha.109.192644.
7. Matthews D.R., Hosker P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985; 28: 412-9. DOI:10.1007/bf00280883.
8. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106: 3143–3421. DOI:10.1161/circ.106.25.3143.
9. Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R., Donato K.A., Eckel R.H., Franklin B.A. et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Current Opinion in Cardiology*. 2006; 21(1):1-6. DOI:10.1097/01.hco.0000200416.65370.a0.
10. International Diabetes Federation. Worldwide definition of the meta-bolic syndrome. Available at https://www.idf.org/_Metasyn-drome_definition.pdf. Accessed August 24, 2005.

11. Bloomgarden Z.T. American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) Consensus Conference on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care*. 2003; 26:933–9. DOI:10.2337/diacare.26.3.933.
12. Maalouf N.M., Cameron M.A., Moe O.W., Adams-Huet B., Sakhaee K. Low urine pH: a novel feature of the metabolic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2007; 2(5): 883-8. DOI:10.2215/cjn.00670207.
13. Pigarova E.A., Rozhinskaya L.Y., Belaya Zh.E., Dzeranova L.K., Karonova T.L., Il'in A.V. et al. II. Russian Association of Endocrinologists recommendations for diagnosis, treatment and prevention of vitamin D deficiency in adults. *Problemy endokrinologii*. 2016; 4: 60-1. DOI: 10.14341/probl201662460-84. (in Russian)
14. Katsuki A. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24: 362-5. DOI:10.2337/diacare.24.2.362.
15. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013; 310(20):2191-4. DOI:10.1001/jama.2013.281053.
16. Borovikov V. P. Statistica. The Art of Analyzing Data on a Computer: For Professionals. St.Petersburg: Piter; 2003. DOI:10.1007/978-3-642-60946-6_108. (in Russian)
17. Hagstrom E., Bergström G., Rosengren A., Brolin E.B., Brandberg J., Cederlund K. et al. Impact of body weight at age 20 and weight gain during adulthood on midlife coronary artery calcium in 15,000 men and women: an interim analysis of the Swedish cardiopulmonary bioimage study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(9):1692, DOI:10.1016/S0735-1097(19)32298-3.
18. Kobalava Zh.D., Kolesnik E.L., Troitskaya E.A. Current European guidelines on arterial hypertension: new positions and unsolved issues. *Clinical pharmacology and therapy*. 2019; 28 (2): 7-18.
19. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018;14(2):88-98. DOI:10.1038/nrendo.2017.151.
20. Borén J., Chapman M.J., Krauss R.M., Packard C.J., Bentzon J.F., Binder C.J. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *European Heart Journal*. 2020; 41(24):2313-30. DOI:10.1093/eurheartj/ehz962.
21. D'Agostino R.B., Pencina M.J., Massaro J.M. Cardiovascular disease risk assessment: insights from Framingham. *Glob. Heart*. 2013; 8(1):1-11. DOI:10.1016/j.ghheart.2013.01.001.
22. Chung D.W., Chen J., Ling M. et al. High density lipoprotein modulates thrombosis by preventing von Willebrand factor self-association and subsequent platelet adhesion. *Blood*. 2015; 127: 637-45. DOI:10.1182/blood-2014-09-599530.
23. Skretteberg P.T., Grytten A.N., Gjertsen K., Grundvold I., Kjeldsen S.E., Erikssen J. et al. Triglycerides-diabetes association in healthy middle-aged men: Modified by physical fitness? A long term follow-up of 1962 Norwegian men in the Oslo Ischemia Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2013;101(2):201-9. DOI:10.1016/j.diabres.2013.06.001.
24. Mostaza J.M., Vega G.L., Snell P., Grundy S.M. Abnormal metabolism of free fatty. *J. Intern.Med.* 1998; 243(4): 265-74. DOI:10.1046/j.1365-2796.1998.00298.x.
25. Van der Aa M.P., Knibbe C.A., Boer A., Van der M.M. Vorst Definition of insulin resistance affects prevalence rate in pediatric patients: a systematic review and call for consensus. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2017; 30: 123-7. DOI:10.1515/jpem-2016-0242.
26. Gayoso-Diz P., Otero-González A., Rodríguez-Alvarez M.X. Insulin resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocr. Disord.* 2013; 13 (1):1-11. DOI:10.1186/1472-6823-13-47.
27. Lauterbach M.A., Wunderlich F.T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Pflügers Arch.* 2017;469(3–4):385-91. DOI:10.1007/s00424-017-1955-5.
28. Xiao J., Shen C., Chu M.J., Gao Y.X., Xu G.F., Huang J.P. et al. Physical Activity and Sedentary Behavior Associated with Components of Metabolic Syndrome among People in Rural China. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147062. DOI:10.1371/journal.pone.0147062.
29. Klebanova E.M., Balabolkin M.I., Kreminskaya V.M. The importance of adipose tissue and its hormones in the mechanisms of insulin resistance and the development of type 2 diabetes mellitus. *Klinicheskaya meditsina*. 2007; 7: 20-7. (in Russian)
30. Ginzburg M.M., Kozupitsa G.S. Insulin resistance syndrome. *Problemy endokrinologii*. 1997; 1:40-3. (in Russian)
31. Kaufman M., Guglin M. Uric acid in heart failure: a biomarker of therapeutic target? *Heart Fail. Rev.* 2013; 18:177-86. DOI:10.1007/s10741-012-9322-2.
32. Hare J.M., Johnson R.J. Uric acid predicts clinical outcomes in heart failure: insights regarding the role of xanthine oxidase and uric acid in disease pathophysiology. *Circulation*. 2003;107:1951-3. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000066420.36123.35>.
33. Wei S.H., Lin J.D., Hsu C.H., Wu C.Z., Lian W.C., Chen Y.L., et al. Higher uric acid is associated with higher rate of metabolic syndrome in Chinese elderly. *European Geriatric Medicine*. 2014; 5(1):26-30. <https://doi.org/10.1016/j.eurger.2013.10.006>.
34. Kobalava Zh.D., Troitskaya E.A. Asymptomatic hyperuricemia and risk of cardiovascular and renal diseases. *Kardiologiya*. 2020; 60(10):113-21. DOI: 10.18087/cardio.2020.10.n1153. (in Russian)
35. Ekundayo O.J., Dell'Italia L.J., Sandersa P.W., Arnetta D., Abana I., Lovec T.E., et al. Association between hyperuricemia and incident heart failure among older adults: A propensity-matched study. *International Journal of Cardiology*. 2010;142 (3): 279-87. DOI:10.1016/j.ijcard.2009.01.010.
36. Holick M.F. The vitamin D deficiency pandemic: A forgotten hormone important for health. *Pubic. Health Rev.* 2010; 32:267–83. DOI:10.1007/bf03391602.
37. Pan G.T., Guo J.F., Mei S.L., Zhang M.X., Hu Z.Y., Zhong C.K. et al. Vitamin D deficiency in relation to the risk of metabolic syndrome in middle-aged and elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2016; 62:213-9. DOI:10.3177/jnsv.62.213.
38. Kaseb F., Haghighifard K., Salami M.S., Ghadiri-Anari A. Relationship between vitamin D deficiency and markers of metabolic syndrome among overweight and obese adults. *Acta Med. Iran*. 2017; 55: 399-403.
39. Mansouri M., Abasi R., Nasiri M., Sharifi F., Vesaly S., Sadeghi O. et al. Association of vitamin D status with metabolic syndrome and its components: A cross-sectional study in a population of high educated Iranian adults. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2018;12(1):393-8. DOI:10.1016/j.dsx.2018.01.007.
40. Dawson-Hughes B., Staten M.A., Knowler W.C., Nelson J., Vickery E.M., LeBlanc E.S. et al. Intratrial exposure to vitamin D and new-onset diabetes among adults with prediabetes: a secondary analysis from the vitamin D and type 2 diabetes (D2d) study. *Diabetes Care*. 2020; 43:2916-22. DOI:10.2337/dc20-1765.
41. Oliveira M.A., Faerstein E., Koury J.C., Pereira-Manfro W.F., Milagres L.G., Neto J.F.N. et al. Vitamin D is directly associated with favorable glycemic, lipid, and inflammatory profiles in individuals with at least one component of metabolic syndrome irrespective of total adiposity: Pró-Saúde Study, Brazil. *Nutrition Research*. 2021; 96: 1-8. DOI:10.1016/j.nutres.2021.10.002.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Кузнецова Т.А., Андриков Б.Г., Половов С.Ф., Гажа А.К.

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА ОЖГОВОЙ ТРАВМЫ И ИММУНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Дальневосточный филиал ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» ГВМУ Министерства обороны Российской Федерации, 690013, Владивосток, Россия

Ожоги являются одними из самых распространенных травматических повреждений в мире, представляя собой глобальную проблему общественного здравоохранения. Обширные ожоги (тяжелая ожоговая травма или ожоговая болезнь) являются одной из самых опасных для жизни травм. Существует большая потребность в выявлении и мониторинге развития осложнений (сепсиса и септического шока, коагулопатии и ДВС-синдрома) у пациентов с ожогами. В основе патогенеза ожоговой травмы, как и любого общепатологического процесса, лежит воспалительная реакция, направленная в конечном итоге на восстановление структуры и функции поврежденной ткани. Особенностью воспалительной реакции при ожоговой травме является масштабность альтерации кожи и слизистых. В обзоре представлены основные аспекты иммунопатогенеза ожоговых травм и особенности постожоговой иммунной дисфункции, проявляющейся нарушениями в системах врожденного и адаптивного иммунитета. Акцентировано внимание на роль в иммунопатогенезе развивающихся системных и местных нарушений при ожоговой травме и в защите от бактериальных инфекций минорных субпопуляций лимфоцитов (Treg-, Th-17-, $\gamma\delta$ T-клеток). Дана характеристика основных иммунобиохимических маркеров ожоговой травмы (цитокинов и факторов роста, оксида азота, матриксных металлопротеаз, показателей бактериального обсеменения). Показана прогностическая роль этих биомаркеров в оценке тяжести состояния больных с ожоговой травмой и процессов ранозаживления.

Обзор составлен с использованием ссылок из основных баз данных, таких, как РИНЦ, Web of Science, PubMed, Scopus, Elsevier и Google Scholar (по состоянию на март 2022 г.). После анализа литературы из этих баз данных были отобраны сведения, относящиеся к теме данного обзора (60 ссылок).

Ключевые слова: ожоговая травма; маркеры; врожденный и адаптивный иммунитет; цитокины; факторы роста; оксид азота; матриксные металлопротеазы; обзор литературы.

Для цитирования: Кузнецова Т.А., Андриков Б.Г., Половов С.Ф., Гажа А.К. Современные аспекты иммунопатогенеза ожоговой травмы и иммуно-биохимические маркеры ранозаживления (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (8): 451-457. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-451-457>

Для корреспонденции: Кузнецова Татьяна Алексеевна, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. 1 НИИО; e-mail: takuznets@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.04.2022

Принята к печати 21.04.2022

Опубликовано 15.08.2022

Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Polovov S.F., Gazha A.K.

MODERN ASPECTS OF BURN INJURY IMMUNOPATHOGENESIS AND IMMUNO-BIOCHEMICAL MARKERS OF WOUND HEALING (REVIEW OF LITERATURE)

Far Eastern branch of the Federal State Budgetary Institution "State Research and Testing Institute of Military Medicine" State Military Medical University of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 690013, Vladivostok, Russia

Burns are one of the most common traumatic injuries in the world, representing a global public health problem. Major burns (severe burn injury or burn disease) are one of the most life-threatening injuries. There is a great need to identify and monitor the development of complications (sepsis and septic shock, coagulopathy and DIC) in burned patients. The basis of the pathogenesis of burn injury, as well as any general pathological process, is an inflammatory reaction, ultimately aimed at restoring the structure and function of the damaged tissue. A feature of the inflammatory reaction in burn injury is the scale of alteration of the skin and mucous membranes. The review presents the main aspects of the burn injuries immunopathogenesis and the features of post-burn immune dysfunction, manifested by disorders in the innate and adaptive immunity systems. Attention is focused on the role in the immunopathogenesis of developing systemic and local disorders in burn injury. Also the role are discussed of a minor subpopulations of lymphocytes (Treg-, Th-17-, $\gamma\delta$ T-cells) in the immunopathogenesis and in the bacterial infection protection. The characteristics of the main immuno-biochemical markers of burn injury (cytokines and growth factors, nitric oxide, matrix metalloproteases, bacteria concentration levels) are present. The prognostic role of these biomarkers in assessing of the severity degree of patients with burn injury and wound healing processes is shown. The review has been compiled using references from major databases such as RSCI, Web of Science, PubMed, Scopus and Google Scholar (up to march 2022). After obtaining all reports from database, the papers were carefully analyzed in order to find data related to the topic of this review (60 references).

Key words: burn injury; markers; innate and adaptive immunity; cytokines; growth factors; nitric oxide; matrix metalloproteases; review.

For citation: Kuznetsova T.A., Andryukov B.G., Polovov S.F., Gazha A.K. Modern aspects of burn injury immunopathogenesis and immuno-biochemical markers of wound healing (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 451-457 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-451-457>

For correspondence: Kuznetsova T.A., lead researcher of the Far Eastern Branch of the Federal State Budgetary Institution «State Research Institute of Military Medicine»; e-mail: takuznets@mail.ru

Information about authors:

Kuznetsova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>;

Andryukov B.G., <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>;

Polovov S.F., <https://orcid.org/0000-0001-9983-4299>;

Gazha A.K., <https://orcid.org/0000-0002-2672-1629>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.04.2022

Accepted 21.04.2022

Published 15.08.2022

Введение. Ожоги являются одними из самых распространенных травматических повреждений в мире, представляя собой глобальную проблему общественного здравоохранения. Согласно отчету ВОЗ за 2018 г., ежегодно во всем мире происходит около 11 млн случаев ожогов, при этом ожоговые травмы вызывают около 180 000 смертей во всем мире [1].

Две трети всех случаев ожоговых травм происходят в быту. Высокую актуальность имеют ожоги, полученные вследствие военных действий. Характерным является увеличение группы пострадавших с тяжелыми и крайне тяжелыми поражениями. Согласно ежегодно проводимому статистическому анализу оказания специализированной помощи ожоговым больным Общероссийской общественной организацией Общества комбустиологов «Мир без ожогов» в 2017 г. в статистическую обработку вошли 61 427 обратившихся на лечение, из них 41 921 госпитализированы в ожоговые центры и ожоговые отделения [2].

Термическая (ожоговая) рана (травма) – это открытое повреждение или деструкция кожи, ее придатков или слизистых оболочек. Степень тяжести, характер патологических сдвигов в организме и прогноз ожоговых травм зависят, главным образом, от глубины, а также от локализации ожоговых ран и их площади. Имеет значение также возраст, общее состояние пострадавших и ряд других факторов [3]. Обширные ожоги (тяжелая ожоговая травма или ожоговая болезнь) являются одной из самых опасных для жизни травм. Смертность, ассоциированная с ожоговой травмой, оценивается как 321,8 на 1000 населения и составляет около 195 000 смертей в год [2].

Ожоговая болезнь – специфический симптомокомплекс, развивающийся после термической травмы и сопровождающийся повреждением всех саморегулирующихся систем организма. Ответ организма проявляется нервно-рефлекторной, нейроэндокринной и воспалительной системными реакциями. Ожоговая болезнь развивается в выраженной форме при поверхностных ожогах >25-30% площади тела или глубоких >10% [4].

Для пациентов с ожоговой травмой особую значимость приобретает риск инфицирования, особенно внутрибольничного инфицирования, поскольку ожоговая рана представляет собой благоприятную почву для колонизации микроорганизмами эндогенного и экзогенного происхождения. Считается, что до 75% всех смертельных случаев после термических ран вызвано инфекционными осложнениями. При этом возможен

риск, как локального инфицирования ожоговой раны, так и развитие сепсиса. Сепсис – наиболее грозное осложнение обширных ожогов – характеризуется как системная воспалительная реакция (гипервоспаление) на инфекцию [5]. Главным отличием ожогового сепсиса является повышенный риск инфицирования вследствие потери кожного покрова, как первой линии защиты от микробной инвазии [6]. Тяжелая ожоговая травма приводит к значительным нарушениям в системе гемостаза, следствием чего является развитие коагулопатии и ДВС-синдрома [7].

С учетом этого существует большая потребность в выявлении и мониторинге развития осложнений (сепсиса и септического шока, коагулопатии и ДВС-синдрома) у пациентов с ожогами.

Современные аспекты иммунопатогенеза ожоговой травмы. В основе патогенеза ожоговой травмы, как и любого общепатологического процесса, лежит воспалительная реакция, направленная в конечном итоге на восстановление структуры и функции поврежденной ткани. Особенностью воспалительной реакции при ожоговой травме является масштабность альтерации кожи и слизистых. При ожогах этот барьер повреждается в первую очередь. Интенсивность воспалительной реакции зависит от общей площади ожоговой поверхности. Нарастающее повреждение при термическом ожоге вызывает сильную воспалительную реакцию, что в свою очередь приводит к нарушению иммунной функции и наоборот, дисфункция иммунной системы, вызванная ожоговой травмой, усугубляет воспалительную реакцию, что может привести к развитию сепсиса или синдрома системной воспалительной реакции и увеличивает риск смертности [8].

Дисфункция иммунной системы при ожоговых травмах проявляется нарушениями в системах врожденного и адаптивного иммунитета. Эти нарушения возникают уже в начальный послеожоговый период и регистрируются в течение длительного времени после него. Постоянная дисфункция является отличительной чертой пациентов с ожоговой болезнью, находящихся в критическом состоянии. В целом иммунная дисфункция при тяжелом ожоговом повреждении характеризуется системным (гипервоспалительным) иммунным ответом и иммуносупрессией. В то время как первое влечет за собой повреждение тканей, второе предрасполагает к инфекциям [9].

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют, что ожо-

говые травмы связаны с иммуносупрессией. Ярким примером служит клиническое исследование, авторы которого представили результаты динамического наблюдения за иммунным статусом 50 тяжелообожженных пациентов с ожогами, начиная с первых часов после травмы и до 28 дней после госпитализации, проанализирована связь показателей со смертностью на 90-й день [10]. В иммунном статусе этих пациентов выявлено снижение HLA-DR+моноцитов, NKТ-кл, CD8+ Т-клеток, $\gamma\delta$ Т-клеток, В-клеток. При этом больные с наименьшим количеством этих клеточных субпопуляций при поступлении были более склонны к бактериальным осложнениям. Устойчивые нарушения в иммунной системе, наблюдаемые у умерших, были связаны с развитием септического шока [10].

Одними из первых на ожоги реагируют клетки врожденного иммунитета (моноциты/макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, натуральные киллеры (NK), естественные Т-киллеры (NKT)). В этом процессе также участвуют клетки печени (гепатоциты, звездчатые клетки печени, клетки Купфера, клетки эпителия желчных протоков). Реакция иммунокомпетентных и печеночных клеток выражается в синтезе цитокинов, хемокинов, адипоцитокинов и других медиаторов (катехоламины, кортизол, активные формы кислорода (АФК)), опосредующих как местную воспалительную реакцию, так и системный воспалительный процесс [11, 12].

В условиях экспериментальных и клинических исследований представлены многочисленные свидетельства нарушения функциональной активности моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и NK-клеток и показана роль этих клеток в развитии постожоговой иммунной дисфункции [13 – 15].

Нарушения в системе адаптивного иммунитета с первых дней после термической травмы проявляются уменьшением общего содержания Т-лимфоцитов со снижением содержания CD3+, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови и нарушением их функциональной активности [16, 17].

Что касается субпопуляционного состава лимфоцитов, в ряде работ отражена роль CD3+ CD4+ Т-хелперов, в том числе Th-1 (Т-хелперов 1 типа) и Th-2 (Т-хелперов 2 типа) и Th17, CD3+CD8+ Т-клеток, NK и NKT-клеток при ожоговой травме и сепсисе. В частности, показано, что при тяжелых ожоговых травмах выявлено снижение общего количества Т-лимфоцитов за счет субпопуляции Th-2 [12].

В последнее время особое внимание исследователей обращено на роль в иммунопатогенезе ожогов таких минорных субпопуляций, как $\gamma\delta$ Т-клетки (Т-клетки, экспрессирующие $\gamma\delta$ Т-рецепторы ($\gamma\delta$ TCR), Th17, Treg (естественные регуляторные Т-клетки).

В частности, субпопуляция $\gamma\delta$ Т-клеток, относящаяся к клеткам врожденного иммунитета, преобладает в коже и эпителиальных тканях. Эти клетки продуцируют хемокины в ответ на антигены, экспрессируемые поврежденными или активированными кератиноцитами [18], однако, полезные и вредные эффекты $\gamma\delta$ Т-клеток неясны и данные противоречивы. Предполагается, что $\gamma\delta$ Т-клетки имеют двойственное иммунопатогенетическое значение для ожоговой травмы: с одной стороны, они способствуют повышению выживаемости, о чем свидетельствует повышенная смертность, наблюдаемая у мышей с дефицитом $\gamma\delta$ Т-клеток, но с другой стороны $\gamma\delta$ Т-клетки связаны с последующей иммунной дис-

функцией и повреждением периферических органов. В целом, считают, что активация $\gamma\delta$ Т-клеток после ожога является защитной функцией вследствие их участия в иммунном надзоре, восстановлении тканей, заживлении ран [19]. Показано, что у пациентов с синдромом тяжелой системной воспалительной реакции наблюдается повышенная концентрация циркулирующих $\gamma\delta$ Т-клеток [20].

В отношении Th-17 появляется все больше доказательств, подтверждающих роль этих клеток в иммунном ответе после ожога. Посредством цитокинов IL-17 и IL-22 эти клетки способствуют рекрутированию и активации нейтрофилов и предотвращают бактериальную транслокацию, повышая барьерную функцию кишечника. Установлено, что эти клетки вовлекаются в местные и системные иммунные реакции уже через 3 часа после ожоговой травмы, о чем свидетельствует увеличение продуцируемых этими клетками IL-17 и IL-22 в месте ожога и в системном кровотоке [21, 22]. Показано, что Th-17 клетки защищают от местных и системных инфекций, вызванных возбудителями послеожоговых инфекций [22, 23].

В ряде работ показано, что ожоговая травма приводит к дестабилизации баланса между Th17 и Treg, которым принадлежит важная роль в защите от бактериальных инфекций [20, 23]. Th-17, продуцируя IL-17 и IL-22, способствуют поддержанию иммунитета эпителия и слизистых, укрепляя барьерную функцию кожи. Авторы считают, что Th-17 модулируют иммунный и эпителиальный гомеостаз хозяина, особенно на границе хозяин/внешняя среда [22].

О повреждающем влиянии ожоговой травмы на Treg клетки свидетельствует работа М. Hanschen и соавт. [24]. Авторы другой работы решили вопрос об участии Tregs в сепсис-индуцированном иммунопараличе и показали, что повышенные уровни цитокинов, продуцируемых Treg, и маркеров активации на поверхности этих клеток, могут играть важную роль в патогенезе сепсиса и смертности у обожженных [25].

Механизмы, с помощью которых эти субпопуляции лимфоцитов осуществляют свои функции при ожоговой травме, остаются до конца не ясными, но определенно установлено, что конечные эффекторные реакции этих клеток модулируются каскадом цитокинов.

Таким образом, в основе патогенеза ожоговой травмы, как и любого общепатологического процесса, лежит воспалительная реакция. Дисфункция иммунной системы при термических травмах проявляется нарушениями в системах врожденного и адаптивного иммунитета. Все последовательные этапы развития воспаления и иммунного ответа регулируются цитокинами, опосредующими как местную воспалительную реакцию, так и системный воспалительный процесс.

Именно баланс цитокинов и других медиаторов играет решающую роль в регулировании инициирования, прогрессирования и разрешения ран. Дисбаланс между про- и противовоспалительными системами может привести либо к разрушительному гипервоспалению, либо к параличу иммунной системы и развитию сепсиса при ожоговой травме [26].

Всестороннее исследование иммунопатогенеза ожоговой травмы является актуальной задачей, решение которой на современном уровне необходимо для предотвращения осложнений вследствие аномального иммунного ответа, а также для разработки методов эффек-

тивного лечения ожогов, в том числе, способов модуляции защитного потенциала макроорганизма.

Важнейшим аспектом для прогноза ответной реакции на ожоговую травму, вероятности развития осложнений, оценки процессов ранозаживления и, в конечном итоге, индивидуального лечения каждого конкретного больного является мониторинг ряда иммуно-биохимических показателей (маркеров).

Иммуно-биохимические маркеры ожоговой травмы. В иммунопатогенезе развивающихся системных и местных нарушений при ожоговой травме участвуют многочисленные биологически активные вещества. Как представлено в последнем обзоре, в общей сложности идентифицировано 59 биомаркеров, связанных с ожоговой травмой. В их числе маркеры, связанные с метаболизмом, процессами воспаления и заживления ран [27].

Различают системные и местные биомаркеры ожоговой травмы. Оценка тех и других важна как для понимания механизмов ранозаживления, так и для прогноза тяжести состояния больных с ожоговой травмой и адекватности проводимой терапии [26 – 29].

С учетом иммунопатогенеза для прогнозирования процесса ранозаживления в числе наиболее важных (ключевых) иммуно-биохимических маркеров (или сенсоров) выделяют цитокины и факторы роста, оксид азота (NO), активные метаболиты кислорода (АФК), протеазы, а также показатели бактериального обсеменения [27, 29].

Цитокины. Цитокинам принадлежит существенная роль в иммунопатогенезе ожоговой травмы, в связи с чем эти медиаторы относят к важнейшим маркерам ранозаживления. В развитии воспаления при ожогах значимая роль принадлежит как провоспалительным (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , IFN γ и др.), так и противовоспалительным (IL-4, IL-10 и др.) цитокинам. Провоспалительные цитокины принимают участие в механизмах хронизации ожоговой раны, оказывая существенное влияние на течение и исход воспалительно-репаративных процессов. Повышенная продукция провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6 и др.) удлиняет воспалительную фазу, что приводит к образованию хронических ран или гипертрофических рубцов [30]. Кроме того, некоторые цитокины в качестве медиаторов воспаления и образующиеся в результате свободные радикалы повышают продукцию АФК и вызванное ферментами повреждение тканей, а также снижают уровень эндогенных антиоксидантов, что также приводит к нарушению заживления ран [31]. Функция цитокинов с противовоспалительным действием – ингибирование избыточного синтеза основных провоспалительных цитокинов, что способствует ограничению области повреждения.

Установлено, что величина и динамика изменений провоспалительных цитокинов отражает тяжесть течения ожоговой болезни и характер заживления ожогов. Большинство исследователей отмечают, что уровень этих цитокинов в сыворотке крови сразу после ожога значительно возрастает, а ко 2-3-й неделям после ожога снижаются. Так, уже через час после ожога выявлен ранний синтез провоспалительных цитокинов, продуцируемых Th1 (TNF α и IFN γ), которые участвуют в активации макрофагов. В то же время не наблюдалось повышения уровня IL-6 и IL-1 β и противовоспалительных цитокинов [32]. В динамике развития ожоговой травмы выявлено выраженное и длительное повышение уров-

ня IL-1, IL-6, IL-8 и TNF α в крови, что сопровождалось нарушением процессов репаративной регенерации, замедлением заживления [29, 33, 34]. О повышении уровнях как про-, так и противовоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-6, IL-8, IL-17, IL-4, IL-10,) в начальные сроки после ожоговой травмы сообщается в ряде работ [35 – 37]. Повышенные уровни про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке сохранялись в течение 6-8 мес после ожога [38, 39].

В совокупности эти результаты свидетельствуют, что цитокины обладают большим потенциалом для прогноза исходов ожоговой болезни и ранней диагностики ожогового сепсиса.

Факторы роста. Важную роль в восстановлении тканей и заживлении ран играют различные факторы роста. Сообщается об увеличении в сыворотке крови фактора роста гепатоцитов (HGF), способствующего заживлению ран посредством стимуляции подвижности и морфогенеза эпителиальных клеток и играющему важную роль в ангиогенезе, в течение как минимум 2-х недель после ожога [40]. Также отмечено повышенное содержание фактора роста, влияющего на клеточную миграцию, клеточную пролиферацию и ангиогенез (TGF α) [41] и эпидермального фактора роста (EGF) [42]. Множество функций в организме, включая клеточную дифференцировку, иммунную регуляцию и заживление ран выполняет фактор роста TGF β 1. При ожогах функция TGF β 1 в значительной мере связана с выработкой коллагена и образованием рубцов [43]. Показано, что уровень TGF β 1 в его активной форме был значительно ниже у детей в первый день после ожога по сравнению со здоровыми [44], тогда как общий уровень TGF β 1 у детей с ожогами и здоровыми детьми значительно не различался. В то же время уровень основного фактора роста фибробластов (bFGF), также участвующего в репарации и регенерации ткани после ожоговой травмы у детей, повышался при их поступлении на лечение [41]. Сообщается о повышенных уровнях провоспалительных колониестимулирующих факторов G-CSF и GM-CSF в сыворотке крови продолжительностью до 3-х лет после ожога [39].

Протеазы. Протеазы – это ферменты, ответственные за расщепление белков, в первую очередь катализирующие реакции деградации компонентов внеклеточного матрикса. Матричные металлопротеиназы (ММП) и их ингибиторы (тканевые ингибиторы металлопротеиназы – ТИМП), также относящиеся к белкам острой фазы, играют фундаментальную роль в ремоделировании внеклеточного матрикса как в нормальных, так и в патологических состояниях [45, 46]. Изменения внеклеточного матрикса вовлечены в патогенез ожоговых ран, в частности, ММП участвуют в опосредовании ряда биологических процессов, таких, как воспаление, ремоделирование тканей и ангиогенез [46]. Нарушение регуляции ММП приводит к длительному воспалению и замедлению заживления ран, в связи с этим ММП являются важными биомаркерами для оценки ранозаживления при ожогах.

Основными (ключевыми) протеазами, участвующими в качестве медиаторов коллагенового матрикса во время ремоделирования и реэпителизации раны, являются ММП-2, ММП-7 и ММП-9. Изменения уровней протеаз и их ингибиторов коррелируют с заживлением ран [47, 48].

Как правило, уровень ММП увеличивается в ранах, поскольку они необходимы для разрушения раневого

ложа, что способствует заживлению ран и формированию рубцов [49]. Показано, что концентрация ММП была выше в незаживающих ранах по сравнению с хорошо заживающими ранами [29, 50]. Значительное повышение ММП-2 с 3 до 21 дня после ожога отметили A. Weremijewicz и соавт. [51]. Повышенные уровни ProMMP-1, MMP-3 и MMP-9 в течение первых 3 недель после ожоговой травмы выявлены M.R. Dasu и соавт. [52].

Оксид азота. В качестве биомаркера ранозаживления показательным является уровень оксида азота (NO). NO является мощным вазодилататором, ингибитором агрегации тромбоцитов, нейротрансмиттером неадренергических, холинергических нейронов, вызывающих релаксацию гладкой мускулатуры ряда органов и тканей [53]. NO рассматривают как важный фактор иммунологической реактивности, необходимый для осуществления регуляторных цитопротекторных процессов на уровне органелл клетки и всего организма, участвующий в антимикробной защите. Помимо прямого антимикробного действия, NO принимает участие в механизмах воспаления, выполняя как провоспалительную, так и противовоспалительную функции [54]. С активацией образования оксида азота и свободных радикалов кислорода при ожоговой травме связывают формирование вторичного иммунодефицитного состояния [4].

Об изменении активности генерации NO и его функции при термической травме свидетельствуют многочисленные экспериментальные и клинические исследования. В клинических условиях наиболее выраженный рост концентрации метаболитов NO отмечался на 3-и сутки после термического ожога (до 134,3%) и сохранялся повышенным на всем протяжении срока наблюдения (до 21-х суток) [4]. В то же время, по данным J.V. Boukin и соавт. [55], концентрация NO в хронических незаживающих ранах была значительно снижена. Однако, как отмечают авторы, период полураспада NO составляет менее 10 с, что затрудняет его измерение. В связи с этим предпринимались попытки измерить уровни NO в раневой жидкости косвенно, через показатель уровня нитрата в раневой жидкости и взятой натощак моче [55].

Восстановление нормального уровня метаболитов азота как в очаге, так и в периферической крови при использовании ранозаживляющих лекарственных средств сопровождается позитивной динамикой заживления ожога [56]. Авторы считают, что лишение активности NO приводит к нарушению процессов заживления, а комплексный мониторинг NO, ММП и уровня бактериальной нагрузки будет способствовать ускорению заживления хронических ран [55].

Показатель бактериального обсеменения. Ожоговая рана представляет собой благоприятную почву для колонизации микроорганизмами эндогенного и экзогенного происхождения. Инфицирование ожоговой раны – один из наиболее частых и тяжелых осложнений обширных ожогов и основная причина развития сепсиса [57]. Микрофлору ожоговых ран отличает видовой полиморфизм с преобладанием условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее часто встречающимися бактериями в хронических ранах являются *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. По суммарной клинической значимости *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* spp. и *Staphylococcus epidermidis* являются доминирующими патогенами ожоговых стационаров [50, 58]. Кроме того,

вследствие глубокой иммуносупрессии ожоговые больные часто инфицируются не только бактериальными патогенами, но также возбудителями вирусных или грибковых инфекций.

В качестве биомаркера инфицирования и ранозаживления используется показатель бактериального обсеменения или показатель концентрации бактерий. В хронических ранах этот показатель аномально повышен [29, 55].

Выявление кандидатных биомаркеров ранозаживления продолжается. Перспективным направлением является изготовление биохимических сенсоров для выявления различных биомаркеров, что позволило бы провести их количественную оценку [29]. В этом аспекте сообщается о разработке нескольких датчиков для контроля бактериального обсеменения раны [29]. Предложено количественное определение уровня NO в сложных физиологических средах, таких, как кровь и структуры мозга с помощью электрохимических датчиков [60].

Заключение. Таким образом, в иммунопатогенезе развивающихся местных и системных нарушений при ожоговой травме участвуют многочисленные биологически активные вещества, относящиеся к медиаторам воспаления. Наибольшее значение при ожоговой травме имеют цитокины, хемокины и факторы роста, оксид азота, протеазы, показатель бактериального обсеменения. Эти иммуно-биохимические маркеры рассматриваются как прогностические биомаркеры тяжести состояния больных с ожоговой травмой и адекватности проводимой терапии.

Продолжаются исследования по поиску новых кандидатных биомаркеров и методов их выявления, позволяющих не только прогнозировать заживление ран, но и открывать новые потенциальные мишени для терапевтического вмешательства при ожогах.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5-6, 8-16, 18-25, 27-32, 34-55, 59-60 см. REFERENCES)

- Алексеев А.А., Тюриков Ю.И. Основные статистические показатели работы медицинских организаций России по оказанию специализированной медицинской помощи пострадавшим от ожогов в 2017-2018 гг. Всероссийский симпозиум с международным участием «Инновационные технологии лечения ожогов и ран: достижения и перспективы» 22-23 ноября 2018 года. *Комбустология*. 2018. Электронный научно-практический журнал. № 61/2018. <http://combustiology.ru/journal/sborniknauchny-h-rabotchast-pervaya/>.
- Глуткин А.В., Ковальчук В.И. Термический ожог кожи у детей раннего возраста (опыт эксперимента и клиники): монография. Гродно: Гродненский госмедуниверситет; 2016.
- Иваненко И.Л., Гладилин Г.П., Шулаева Н.М., Островский Н.В., Никитина В.В., Веретенников С.И., Калинычева А.Е. Прогностическое значение гемокоагуляционных тестов у пациентов с тяжелыми ожогами. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 2. <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24154>.
- Городинская Н.А., Алейник Д.Я., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Фролов А.П. Роль рецепторов врожденного иммунитета в патогенезе ожоговой болезни. *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2014; 1:92. <https://science-medicine.ru/ru/article/view?id=120>.
- Алексеев А.А., Ушакова Т.А., Крутиков М.Г., Бобровников А.Э. Маркеры сепсиса в диагностике адаптивного воспаления при ожоговой травме. *Лечение и профилактика*. 2015; 2(14): 84-91.
- Кривошапка А.В., Ермоленко Т.И. Провоспалительные цитокины в патогенезе экспериментального ожога. Харьков: Планета-Принт; 2018.
- Кузник В.И., Витковский Ю.А., Сазоненко В.А., Варфоломеев А.Р., Будажабон Г.Б. Влияние тималина на иммунитет, гемостаз

и уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при ожоговой болезни. *Гематология и трансфузиология*. 2002; 47(1): 17-21.

56. Звягинцева Т. В., Кривошапка А.В., Желнин Е.В. Роль метаболитов оксида азота в механизмах развития экспериментального ожога. *Экспериментальная и клиническая медицина*. 2011; 51(2):5-9.
57. Крутиков М.Г. Проблемы инфекции у обожженных. *Комбустиология*. 2002. Электронный научно-практический журнал. №10/2002. http://combustiolog.ru/number_journal/nomer-10-2002/.
58. Митряшов К.В., Шаркова В.А., Усов В.В., Максема И.Г., Грибань П.А. Разнообразие микробных сообществ ожоговых ран. *Журнал Неотложная хирургия им. И.И. Джанелидзе*. 2021;1:42-6.

REFERENCES

1. National Burn Repository 2019 Update, Report of data from 2009–2018 ameriburn.sitem.com. 2019. <https://ameriburn.sitem.com/store/ViewProduct.aspx?id=14191872>.
2. Alekseev A.A., Tyurnikov Yu.I. The main statistical indicators of the work of medical organizations in Russia to provide specialized medical care to victims of burns in 2017-2018 [Vserossiyskiy simpozium s mezhdunarodnym uchastiem «Innovatsionnye tekhnologii lecheniya ozhogov i ran: dostizheniya i perspektivy»]. *Kombustologiya*; 2018. № 61/2018. <http://combustiolog.ru/journal/sborniknauchny-hrabot-chast-pervaya/>. (in Russian)
3. Zhang P., Zou B., Liou Y.C., Huang C. The pathogenesis and diagnosis of sepsis post burn injury. *Burns Trauma*. 2021; 9:tkaa047. DOI: 10.1093/burnst/tkaa047.
4. Glutkin A.V., Kovalchuk V.I. Thermal skin burn in infants (experimental and clinical experience): monografiya. Grodno:Grodenskiy gosmeduniversitet; 2016. (in Russian)
5. Boehm D., Menke H. Sepsis in Burns – Lessons Learnt from Developments in the Management of Septic Shock. *Medicina*. 2021; 58(1): 26. DOI: 10.3390/medicina58010026.
6. Donnelly J.P., Chen S.C., Kauffman C.A., Steinbach W.J., Baddley J.W., Verweij P.E. et al. Revision and update of the consensus definitions of invasive fungal disease from the european organization for research and treatment of cancer and the mycoses study group education and research consortium. *Clin. Infect. Dis*. 2020; 71(6):1367–76. DOI: 10.1093/cid/ciz1008.
7. Ivanenko I. L., Gladilin G. P., Shulaeva N.M., Ostrovskiy N.V., Nikitina V.V., Veretennikov S.I., Kalinycheva A.E. Prognostic value of hemocoagulation tests in patients with severe burns. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 2. <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=24154>. (in Russian)
8. Evers L.H., Bhavsar D., Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp. Dermatol*. 2010; 19(9):777–83. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x.
9. Ravat F., Payre J., Peslages P., Fontaine M., Sens N. Burn: an inflammatory process. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2011; 59:e63–72.
10. Moins-Teisserenc H., Cordeiro D.J., Audigier V., Ressaie Q., Benyamina M., Lambert J. et al. Severe altered immune status after burn injury is associated with bacterial infection and septic shock. *Front Immunol*. 2021; 12:586195. DOI: 10.3389/fimmu.2021.586195.
11. Porter C., Tompkins R.G., Finnerty C.C., Sidossis L.S., Suman O.E., Herndon D.N. The metabolic stress response to burn trauma: Current understanding and therapies. *Lancet*. 2016; 388(10052):1417–26. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31469-6.
12. Schwacha M.G. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*. 2003; 29(1):1–14. DOI: 10.1016/s0305-4179(02)00187-0.
13. Herrmann J. Rescuing macrophage function following severe thermal injury. *J. Surg. Res*. 2009; 157(2):158-60. DOI: 10.1016/j.jss.2009.04.023.
14. Luo G., Peng D., Zheng J., Chen X., Wu J., Elster E.A., Tadaki D.K. The role of NO in macrophage dysfunction at early stage after burn injury. *Burns*. 2005; 31(2):138-44. DOI:10.1016/j.burns.2004.09.009.
15. Laggner M., Lingitz M.T., Copic D., Direder M., Klas K., Bormann D. et al. Severity of thermal burn injury is associated with systemic neutrophil activation. *Sci. Rep*. 2022; 12(1):1654. DOI: 10.1038/s41598-022-05768-w.
16. Gosain A., Gamelli R.L. A primer in cytokines. *J. Burn. Care Rehabil*. 2005; 26(1):7–12. DOI: 10.1097/01.bcr.0000150214.72984.44.
17. Gorodinskaya N.A., Aleynik D.Ya., Rubtsova Yu.P., Charykova I.N., Frolov A.P. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of burn disease. Scientific review. *Meditsinskie nauki*. 2014; 1:92. <https://science-medicine.ru/ru/article/view?id=120>. (in Russian)
18. Toth B., Alexander M., Daniel T., Chaudry I.H., Hubbard W.J., Schwacha M.G. The role of $\gamma\delta$ T cells in the regulation of neutrophil-mediated tissue damage after thermal injury. *J. Leukoc. Biol*. 2004; 76(3): 545–52. DOI: 10.1189/jlb.0404219.
19. Schwacha M.G., Ayala A., Chaudry I.H. Insights into the role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in the immunopathogenic response to thermal injury. *J. Leukoc. Biol*. 2000; 67(5): 644–50.
20. Kim A., Lang T., Xue M., Wijewardana A., Jackson C., Vandervord J. The Role of Th-17 Cells and $\gamma\delta$ T-Cells in Modulating the Systemic Inflammatory Response to Severe Burn Injury. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18(4):758. DOI: 10.3390/ijms18040758.
21. Sasaki J.R., Zhang Q., Schwacha M.G. Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns*. 2011; 37(4): 646–51. DOI: 10.1016/j.burns.2011.01.028.
22. Rani M., Zhang Q., Schwacha M.G. Burn wound $\gamma\delta$ T-cells support a Th2 and Th17 immune response. *J. Burn. Care Res*. 2014; 35(1): 46–53. DOI: 10.1097/01.bcr.0000440705.91099.cc.
23. Rendon J.L., Choudhry M.A. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J. Leukoc. Biol*. 2012; 92(3):529–38. DOI: 10.1189/jlb.0212083.
24. Hanschen M., Tajima G., O'Leary F., Ikeda K., Lederer J.A. Injury induces early activation of T-cell receptor signaling pathways in CD4+ regulatory T cells. *Shock*. 2011; 35(3): 252-7. DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181f489c5.
25. Huang L.f., Yao Ym., Dong N., Yu Y., He L., Sheng Z. Association between regulatory T cell activity and sepsis and outcome of severely burned patients: a prospective, observational study. *Crit. Care*. 2010; 14. R3. DOI: 10.1186/cc8232.
26. Alekseev A.A., Ushakova T.A., Krutikov M.G., Bobrovnikov A.E. Sepsis markers in the diagnosis of adaptive inflammation in burn injury. *Lechenie i profilaktika*. 2015; 2(14): 84-91. (in Russian)
27. Carlton M., Voisey J., Parker T.J., Punyadeera C., Cuttle L. A review of potential biomarkers for assessing physical and psychological trauma in paediatric burns. *Burns trauma*. 2021; 9; 9: tkaa049. DOI: 10.1093/burnst/tkaa049.
28. Boldeanu L., Boldeanu M.V., Bogdan M., Meca A.D., Coman C.G., Buca B.R., Tartau C.G., Tartau L.M. Immunological approaches and therapy in burns (Review). *Exp. Ther. Med*. 2020; 20: 2361-7. DOI: 10.3892/etm.2020.8932.
29. Mohd J., Shah Y., Omar E., Pai D.R., Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J. Plast. Surg*. 2012; 45(2): 220-8. DOI: 10.4103/0970-0358.101282.
30. Harding K.G., Morris H.L., Patel G.K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. *BMJ*. 2002; 324(7330):160–3. DOI: 10.1136/bmj.324.7330.160.
31. Pandey K.B., Rizvi S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med. Cell Longev*. 2009; 2(5):270–8. DOI: 10.4161/oxim.2.5.9498.
32. Vinaik R., Abdullahi A., Barayan D., Jeschke M.G. NLRP3 inflammasome activity is required for wound healing after burns. *Transl. Res*. 2020; 217:47-60. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.11.002.
33. Krivoschapka A.V., Ermolenko T.I. Pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of experimental burns. Khar'kov: Planeta-Print; 2018. (in Russian)
34. Widgerow A.D., King K., Tussardi I.T., Banyard D.A., Chiang R., Awad A. The burn wound exudate—an under-utilized resource. *Burns*. 2015; 41(1):11–7. DOI: 10.1016/j.burns.2014.06.002.
35. Kuznik V.I., Vitkovskiy Yu.A., Sazonenko V.A., Varfolomeev A.R., Budazhabon G.B. Influence of thymalin on immunity, hemostasis and the level of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in burn disease. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2002; 47(1): 17-21. (in Russian)
36. Homyrda L., Toubert A., Legrand M. Severe Altered Immune Status After Burn Injury Is Associated With Bacterial Infection and Septic Shock. *Front. Immunol*. 2021; 12:586195. DOI: 10.3389/fimmu.2021.

37. Finnerty C.C., Herndon D.N., Chinkes D.L., Jeschke M.G. Serum cytokine differences in severely burned children with and without sepsis. *Shock*. 2007; 27(1):4–9. DOI: 10.1097/01.shk.0000235138.20775.36.
38. Finnerty C.C., Herndon D.N., Przkora R., Pereira C.T., Oliveira H.M., Queiroz D.M. Cytokine expression profile over time in severely burned pediatric patients. *Shock*. 2006; 26(1):13–9. DOI: 10.1097/01.shk.0000223120.26394.7d.
39. Jeschke M.G., Gauglitz G.G., Kulp G.A., Finnerty C.C., Williams F.N., Kraft R. Long-term persistence of the pathophysiologic response to severe burn injury. *PLoS One*. 2011; 6(7):e21245. DOI: 10.1371/journal.pone.0021245.
40. Jeschke M.G., Barrow R.E., Herndon D.N. Extended hypermetabolic response of the liver in severely burned pediatric patients. *Arch. Surg.* 2004; 139(6):641–7. DOI: 10.1001/archsurg.139.6.641.
41. Abdel-Hafez N.M., Saleh Hassan Y., El-Metwally T.H. A study on biomarkers, cytokines, and growth factors in children with burn injuries. *Ann. Burns Fire Disasters*. 2007; 20(2):89–100.
42. Sherbet G.V. The epidermal growth factor (EGF) family. In: Sherbet G.V., ed. *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*. London: Elsevier; 2011.
43. Tan J., Wu J. Current progress in understanding the molecular pathogenesis of burn scar contracture. *Burns Trauma*. 2017; 5:14. DOI: 10.1186/s41038-017-0080-1.
44. Rorison P., Thomlinson A., Hassan Z., Roberts S.A., Ferguson M.W., Shah M. Longitudinal changes in plasma transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children. *Burns*. 2010; 36(1):89–96. DOI: 10.1016/j.burns.2009.03.008.
45. Tikhaeva K.Yu., Rogova L.N., Tkachenko L.V. The role of metalloproteinases in the metabolism of endometrial extracellular matrix proteins in normal and pathological conditions. *Probl. Reproduction*. 2020; 26(4): 22–9. DOI: 10.17116/repro20202604122.
46. Laronha H., Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020; 9(5):1076. DOI: 10.3390/cells9051076.
47. Idrovo J.P., Yang W.L., Jacob A., Ajakaiye M.A., Cheyuo C., Wang Z., Prince J.M., Nicastro J., Coppa G.F., Wang P. Combination of adrenomedullin with its binding protein accelerates cutaneous wound healing. *PLoS One*. 2015; 10:e0120225. DOI: 10.1371/journal.pone.0120225.
48. Park J.H., Choi S.H., Park S.J., Lee Y.J., Park J.H., Song P.H., Cho C.M., Ku S.-K., Song C.-H. Promoting Wound Healing Using Low Molecular Weight Fucoidan in a Full-Thickness Dermal Excision Rat Model. *Mar. Drugs*. 2017; 15(4):112. DOI: 10.3390/md15040112.
49. Xue M., Jackson C.J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Adv. Wound Care*. 2015; 4(3):119–36. DOI: 10.1089/wound.2013.0485.
50. Utz E.R., Elster E.A., Tadaki D.K., Gage F., Perdue P.W., Forsberg J.A., Stojadinovic A., Hawksworth J.S., Brown T.S. Metalloproteinase expression is associated with traumatic wound failure. *J. Surg. Res.* 2010; 159(2):633–9. DOI: 10.1016/j.jss.2009.08.021.
51. Weremijewicz A., Matuszczak E., Sankiewicz A., Tylicka M., Komarowska M., Tokarzewicz A. Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with surface Plasmon resonance imaging (SPRI) biosensors. *Burns*. 2018; 44(4): 931–40. DOI: 10.1016/j.burns.2017.12.001.
52. Dasu M.R., Spies M., Barrow R.E., Herndon D.N. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severely burned children. *Wound Repair Regen*. 2003; 11(3):177–80. DOI: 10.1046/j.1524-475x.2003.11305.x.
53. Luiking Y.C., Engelen M.P., Deutz N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2010; 13(1):97–104. DOI: 10.1097/MCO.0b013e328332f99d.
54. Haycock J.W., Ralston D.R., Morris B., Freedlander E., MacNeil S. Oxidative damage to protein and alterations to antioxidant levels in human cutaneous thermal injury. *Burns*. 1997; 23(7-8):533–40. DOI: 10.1016/s0305-4179(97)00072-7.
55. Boykin J.V. Wound nitric oxide bioactivity: A promising diagnostic indicator for diabetic foot ulcer management. *J. Wound Ostomy Continents Nurs*. 2010; 37(1):25–32. DOI: 10.1097/WON.0b013e3281c68b61.
56. Zvyagintseva T.V., Krivoschapka A.V., Zhelnin E.V. The role of nitric oxide metabolites in the mechanisms of experimental burn development. *Eksperimental'naya i klinicheskaya meditsina*. 2011; 51(2):5–9. (in Russian)
57. Krutikov M.G. Problems of infection in burn patients (Literature review). *Kombustologiya*. 2002; 10. http://combustolog.ru/number_journal/nomer-10-2002/. (in Russian)
58. Mitryashov K.V., Sharkova V.A., Usov V.V., Maksema I.G., Griban' P.A. Diversity of microbial communities of burn wounds. *Zhurnal Neotlozhnaya khirurgiya im. I.I. Dzhanelidze*. 2021; 1:42–6. (in Russian)
59. Mulani M.S., Kamble E.E., Kumkar S.N., Tawre M.S., Pardesi K.R. Emerging strategies to combat ESCAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front in Microbiol*. 2019; 10:539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539.
60. Privett B.J., Shinb J.H., Schoenfisch M.H. Tutorial Review: Electrochemical Nitric Oxide Sensors for Physiological Measurements. *Chem. Soc. Rev*. 2010; 39(6): 1925–35. DOI: 10.1039/b701906h.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Стилиди И.С., Грачев А.Н.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕЗИДЕНТНОГО МИКРОБИОМА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115552, Москва, Россия

Представлены данные комплексного сравнительного исследования таксономического состава резидентного микробиома опухолей 26 больных немелкоклеточным раком легкого. Анализ таксономического разнообразия выявил 10 типов, 280 родов и 788 видов микроорганизмов. Анализ относительного содержания и прогностической значимости проведен для 62 доминирующих родов. Обнаружены отличия относительного содержания бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* между опухолевой и условно нормальной тканью легкого, однако их диагностический потенциал не подтвержден. Проведенный корреляционный анализ не выявил взаимосвязи содержания различных родов бактерий с гистологическим типом опухоли, ее локализацией и возрастом пациентов. Обнаружены различия в содержании исследованных бактерий в зависимости от стадии заболевания, наличия регионарных метастазов и дифференцировки опухоли. Показана прогностическая значимость бактерий родов *Variovorax* и *Pseudoclavibacter* при немелкоклеточном раке легкого. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых эффективных методов диагностики и прогноза немелкоклеточного рака легкого.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого; микробиом; диагностика; прогноз.

Для цитирования: Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Стилиди И.С., Грачев А.Н. Диагностический и прогностический потенциал резидентного микробиома немелкоклеточного рака легкого. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 458-462. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-458-462>

Для корреспонденции: Ковалева Ольга Владимировна, канд. биол. наук, ст. научн. сотр. лаб. регуляции клеточных и вирусных онкогенов; e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-15-00291, <https://rscf.ru/project/22-15-00291/>.

Поступила 21.05.2022

Принята к печати 27.05.2022

Опубликовано 15.08.2022

Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Stilidi I.S., Gratchev A.N.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC POTENTIAL OF THE RESIDENT NON-SMALL CELL LUNG CANCER MICROBIOME

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115552, Moscow, Russia

The data of a comprehensive comparative study of the taxonomic composition of the resident microbiome of tumors from 26 patients with non-small cell lung cancer are presented. Analysis of taxonomic diversity revealed 10 types, 280 genera and 788 species of microorganisms. The analysis of the relative content and prognostic significance was carried out for 62 dominant genera. Differences in the relative abundance of bacteria of the genera *Acinetobacter*, *Halomonas*, and *Chryseobacterium* between tumor and conditionally normal lung tissue were found, but their diagnostic potential was not confirmed. The correlation analysis did not reveal any relationship between the content of various genera of bacteria and the histological type of the tumor, its localization, and the age of the patients. Differences were found in the content of the studied bacteria depending on the stage of the disease, the presence of regional metastases and tumor differentiation. The prognostic significance of bacteria of the genera *Variovorax* and *Pseudoclavibacter* in non-small cell lung cancer was established. The results obtained can be used in the development of new effective methods for the diagnosis and prognosis of non-small cell lung cancer.

Key words: non-small cell lung cancer; microbiome; diagnosis, prognosis.

For citation: Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Stilidi I.S., Gratchev A.N. Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 458-462 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-458-462>

For correspondence: Kovaleva Olga Vladimirovna, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes; e-mail: ovkovaleva@gmail.com

Information about authors:

Kovaleva O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>;
Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>;
Podlesnaya P.A., <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>;
Stilidi I.S., <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>;
Gratchev A.N., <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>.

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

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00291, <https://rscf.ru/project/22-15-00291/>.

Received 21.05.2022

Accepted 27.05.2022

Published 15.08.2022

Введение. Различные исследования показывают, что в настоящее время опухолевое микроокружение нельзя рассматривать без его микробиологической составляющей, и резидентный микробиом опухоли является его неотъемлемым компонентом. Известно, что для многих солидных опухолей микробиом играет важную роль, причем это не ограничено органами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), для которых его присутствие является общепризнанной нормой. Относительно недавно была охарактеризована нормальная микробиота легких, органа, который долгое время считали стерильным. Микробиом легких представляет собой динамичную систему, которая зависит от множества факторов. Разные участки легких могут быть охарактеризованы специфичным микробным «пейзажем», который зависит от аборигенной микрофлоры, иммунного статуса хозяина и факторов внешней среды. Микробиом легких может существенно меняться при различных заболеваниях легких и дыхательных путей. В целом большинство заболеваний можно охарактеризовать дисбактериозом и превалированием патогенных видов микроорганизмов.

Микроорганизмы могут принимать как непосредственное участие в опухолевой трансформации, так и создавать неспецифический хронический воспалительный фон, который может приводить к возникновению опухолей. Например, показано повышение количества двух типов бактерий *Firmicutes* и *TM7* в опухолях легкого. Более того, два рода бактерий *Veillonella* и *Megasphaera* встречались в опухолях легкого значительно чаще других [1]. Также показана связь между злокачественными опухолями легкого и *Mycobacterium tuberculosis*, активность которых стимулирует синтез фактора некроза опухолей, что, в свою очередь, стимулирует онкологические процессы [2]. Современные исследования подтвердили ассоциацию повышенного содержания *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* spp. и *Escherichia coli* с развитием опухолей легкого [3]. По сравнению с контрольными образцами нормальной ткани в опухолях легкого наблюдается повышенное содержание представителей родов *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Streptococcus* [4]. При онкологических заболеваниях в легких также может наблюдаться развитие патогенных микроорганизмов, таких как *Legionella* и *Moraxella* (например, *Moraxella catarrhalis*). Микробиом опухолей легких оказывает влияние на клиническое течение заболевания на различных уровнях. Так, при дисбактериозе легких наблюдается повышение концентрации активных форм кислорода, что приводит к учащению двуцепочечных разрывов ДНК, и, как следствие, воспалительным процессам. В ряде случаев аберранные микроорганизмы в составе микробиоты легких вызывают повышенный синтез интерлейкинов. К примеру, установлена связь между активностью *Haemophilus influenza* и выработкой интерлейкина IL-17, что стимулирует развитие опухолей [5].

Изучение микробиома легких при онкологических заболеваниях имеет ряд ограничений и часто осложнено отсутствием контрольных образцов. Тем не менее, ана-

лиз микробиома, ассоциированного со злокачественными опухолями, может позволить выявить микроорганизмы, присутствие которых специфично для определенных процессов или популяций. Изучение микробиоты легких при онкологических заболеваниях необходимо для исследования влияния микроорганизмов на клиническую картину на разных стадиях опухолевого процесса. Также, изучение микробиоты опухолей легкого позволит выявить микроорганизмы, которые можно рассматривать в качестве биомаркеров онкологических заболеваний [6].

Цель настоящего исследования - изучение резидентного микробиома немелкоклеточного рака легкого и выявление перспективных диагностических и прогностических микроорганизмов.

Материал и методы. В исследование включены 26 больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием пациентов и здоровых доноров, соответствуют этическим стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз у всех больных подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей легкого (ВОЗ, 2021). Описание исследованной выборки представлено в таблице.

ДНК библиотеки для секвенирования гена 16S были подготовлены согласно протоколу Illumina (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с использованием праймеров к V3 и V4 региону гена рибосомальной рРНК [7]. Библиотеки были секвенированы при помощи MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3. Секвенирование проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» (ЦКП ИКВС УрО РАН).

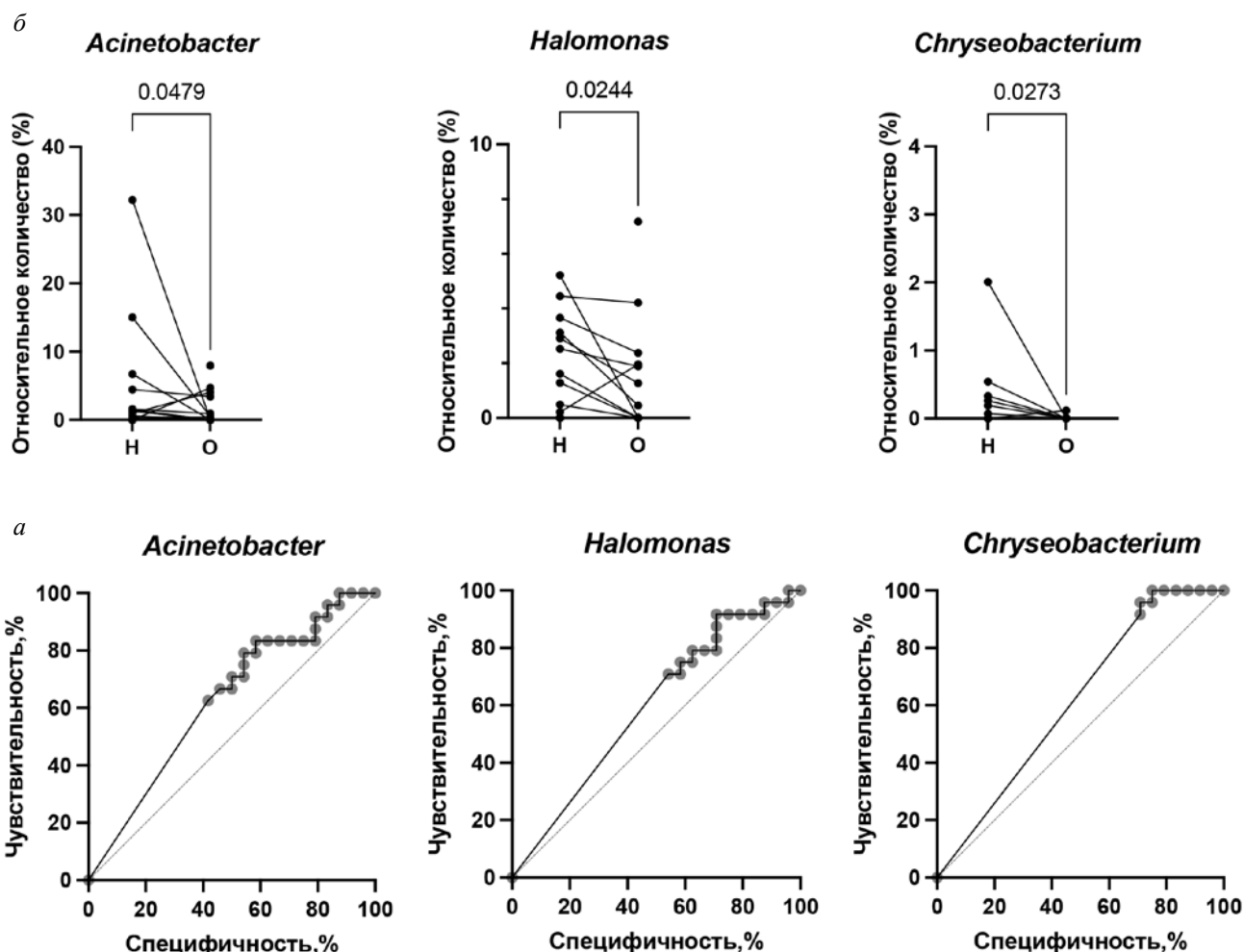
Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Манна-Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых дожития по методу Каплана-Мейера. Сравнение статистической значимости различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В данной работе проведен анализ таксономического состава резидентного микробиома НМРЛ и парных образцов условно нормальной ткани легкого для выявления микроорганизмов, ассоциированных с развитием и течением данно-

Клинико-морфологические характеристики больных НМРЛ

Характеристика	Число случаев, %
Возраст, годы:	
≤61	13 (50%)
>61	13 (50%)
Гистология:	
Аденокарцинома	14 (54%)
Плоскоклеточный рак	12 (46%)
Стадия:	
I-II	12 (46%)
III-IV	14 (54%)
Локализация:	
Центральная	12 (46%)
Периферическая	14 (54%)
Размер опухоли (Т):	
T1-T2	16 (62%)
T3-T4	10 (38%)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	9 (35%)
N+	17 (65%)
Степень дифференцировки (G):	
G1-G2	14 (54%)
G3	12 (46%)

го заболевания. Проведенный анализ выявил 10 типов бактерий, как в опухоли, так и в нормальной ткани легкого. Доминирующими типами были *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Отличий относительного количества бактерий различных типов между опухолевой и условно нормальной тканью не выявлено. Далее проведен анализ таксономического состава микробиома легкого на уровне родов. Всего по результатам секвенирования в образцах опухолей легкого и условно нормальной ткани выявлено 280 родов и 788 видов микроорганизмов. Для дальнейшего исследования выбрали 62 доминирующих рода, относительное содержание которых составило более 0,1%. Проведенный анализ показал значимое отличие относительного количества бактерий 3-х родов: *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* (см. рисунок, а). Следует отметить, что относительное количество данных видов снижалось в опухоли, по сравнению с условно нормальной тканью. Провели анализ информативности диагностического метода с помощью оценки его чувствительности и специфичности путем построения ROC кривых и вычисления площади под ними (AUC). Результаты представлены на рисунке, б.



Анализ бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* при НМРЛ.

а – сравнительный анализ относительного содержания бактерий родов *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* в опухолевой и условно нормальной ткани НМРЛ. б – ROC-анализ для бактерий *Acinetobacter*, *Halomonas* и *Chryseobacterium* у больных НМРЛ.

Проведенный анализ показал, что, несмотря на значимое снижение в опухоли бактерий данных родов, площадь под ROC-кривой, равная 0,624 для *Acinetobacter*; 0,593 для *Halomonas* и 0,615 для *Chryseobacterium* свидетельствует о среднем качестве модели, что не позволяет использовать полученные данные в диагностических целях.

Дополнительно провели анализ родов бактерий, относительное количество которых повышалось в опухоли, по сравнению с условно нормальной тканью легкого, но данное изменение не достигло статистической значимости, хотя и было близко к нему. Выявили единственный род грамотрицательных аэробных бактерий *Sphingomonas*, содержание которого в опухоли составляло 10,58% в то время как в нормальной ткани легкого 1,59% ($p=0,08$). Полученные нами данные подтверждаются литературными, свидетельствующими о том, что содержание бактерий рода *Acinetobacter* снижается при НМРЛ, в то время как относительное количество бактерий рода *Sphingomonas* увеличивается [8].

Рак легкого является гетерогенным заболеванием. Двумя наиболее распространенными типами НМРЛ легкого являются плоскоклеточный рак и аденокарцинома, которые характеризуются различными молекулярными механизмами возникновения и терапевтическими стратегиями [9]. Ввиду того, что плоскоклеточный рак легкого часто ассоциирован с неблагоприятным воздействием внешних факторов (например, курением), можно предположить у таких пациентов колонизацию легкого бактериями, содержащимися в табаке [10].

Далее провели корреляционный анализ между относительным содержанием бактерий доминирующих родов и клинико-морфологическими характеристиками НМРЛ. Однако, опухоли легкого различных гистологических типов, как по результатам настоящего исследования, так и по литературным данным, не отличаются по таксономическому разнообразию микробиома [11, 12]. Также проведенный анализ не выявил корреляций между содержанием бактерий преобладающих родов и локализацией опухоли, а также возрастом пациентов. Интереснее оказалась ситуация с прогрессией заболевания, а именно: со стадией заболевания коррелировало 15 бактериальных родов. Необходимо отметить, что относительное количество бактерий родов *Burkholderia* ($r=-0,4258$ $p=0,030$), *Aquabacterium* ($-0,459$; $p=0,018$) снижается со стадией заболевания, в то время как относительное количество родов *Corynebacterium* ($r=0,449$; $p=0,021$), *Sphingomonas* ($r=0,444$; $p=0,023$), *Streptococcus* ($r=0,460$; $p=0,018$), *Neisseria* ($r=0,421$; $p=0,032$), *Halomonas* ($r=0,408$; $p=0,038$), *Pseudomonas* ($r=0,4488$; $p=0,022$), *Parvimonas* ($r=0,448$; $p=0,022$), *Rothia* ($r=0,501$; $p=0,009$), *Kocuria* ($r=0,421$; $p=0,032$), *Actinomyces* ($r=0,448$; $p=0,022$), *Veillonella* ($r=0,393$; $p=0,047$), *Lactobacillus* ($r=0,393$; $p=0,047$), *Fusobacterium* ($r=0,393$; $p=0,047$) повышается при прогрессии заболевания. Аналогичные результаты были получены в исследовании, которые продемонстрировали изменение содержания бактерий некоторых родов в процессе развития и прогрессии НМРЛ [12]. Анализ взаимосвязи относительного содержания бактерий с регионарным метастазированием выявил обратную корреляцию для бактерий 3-х родов: *Burkholderia*, *Roseomonas* и *Chryseobacterium*.

Анализ таксономического состава микробиома опухолей различной степени дифференцировки выявил отличия в относительном содержании бактерий 7 ро-

дов. Интересно отметить, что относительное содержание бактерий 6 родов (*Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Nesterenkonia*, *Arthrobacter*) было выше в низкодифференцированных опухолях по сравнению с высокодифференцированными, в то время как для бактерий рода *Pseudoclavibacter* наблюдали обратную закономерность.

В литературе представлены единичные работы, посвященные исследованию динамики количественных и качественных изменений микробиома в процессе прогрессирования рака легкого [11, 12]. Так показано, что у пациентов с метастатическим плоскоклеточным раком легкого относительное содержание бактерий родов *Veillonella* и *Rothia* выше, чем у пациентов без верифицируемых метастазов [12]. Полученные нами данные частично согласуются с литературными, что свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования структуры микробиома, ассоциированного с НМРЛ.

Далее нами проведен анализ прогностической значимости 62 исследованных родов бактерий. Корреляционный анализ показал взаимосвязь относительного содержания бактерий 4-х родов (*Serinicoccus*, *Enterobacter*, *Variovorax* и *Pseudoclavibacter*) с выживаемостью пациентов. Для подтверждения данных корреляционного анализа дополнительно провели анализ выживаемости путем построения кривых дожития по методу Каплана-Майера. Проведенный анализ подтвердил прогностическую значимость 2-х родов: *Variovorax* ($HR=7,233$; $p=0,0016$) и *Pseudoclavibacter* ($HR=0,2477$; $p=0,0320$). Следует отметить, что содержание бактерий рода *Variovorax* может служить маркером плохого прогноза ($HR=7,233$; $p=0,0016$), в то время как высокое содержание бактерий рода *Pseudoclavibacter* - маркером благоприятного прогноза.

Исследований, посвященных прогностической значимости резидентного микробиома легкого в литературе немного. Так, показано, что в целом таксономическое разнообразие микробиома опухолей не является прогностически значимым, в то время как высокое содержание бактерий семейств *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* ассоциировано со снижением выживаемости больных НМРЛ [13]. Все это свидетельствует о необходимости продолжения и масштабирования подобных исследований.

Заключение. Изучение развития и прогрессии рака легкого под воздействием бактериальной составляющей долгое время оставалось в тени, однако сейчас, обнаружены некоторые закономерности между данным видом рака и микробиомом. Изучение микробиома легких представляет собой весьма сложную и интересную задачу. На сегодняшний день известно, что легкие обладают уникальным составом микроорганизмов, независимо от популяции и географических особенностей. В настоящее время очевидно, что микробиом легких непосредственно связан с различными, в том числе и онкологическими заболеваниями. Также, следует отметить, что спектр условно-патогенных микроорганизмов, активность которых возрастает существенным образом при развитии в легких онкологических заболеваний, достаточно широк и ежегодно пополняется новыми видами. Диагностический потенциал резидентного микробиома легкого неоднозначен, однако его прогностическая и терапевтическая значимость имеют значительные перспективы. Все это создает предпосылки для дальнейшего изучения состава микробиома легких и его роли при развитии опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lee S.H., Sung J.Y., Yong D., Chun J., Kim S.Y., Song J.H. et al. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions. *Lung Cancer*. 2016; 102: 89-95. DOI:10.1016/j.lungcan.2016.10.016.
2. Bourigault M.L., Vacher R., Rose S., Olleros M.L., Janssens J.P., Quesniaux V.F. et al. Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances Mycobacterium tuberculosis clearance and reduces lung pathology. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2013; 2(1): 124-34.
3. Laroumagne S., Salinas-Pineda A., Hermant C., Murris M., Gourraud P.A., Do C. et al. Incidence and characteristics of bronchial colonisation in patient with lung cancer: a retrospective study of 388 cases. *Rev. Mal. Respir.* 2011; 28(3): 328-35. DOI:10.1016/j.rmr.2010.05.020.
4. Hosgood H.D., Sapkota A.R., Rothman N., Rohan T., Hu W., Xu J. et al. The potential role of lung microbiota in lung cancer attributed to household coal burning exposures. *Environ Mol. Mutagen.* 2014; 55(8): 643-51. DOI:10.1002/em.21878/.
5. Chang S.H., Mirabolfathinejad S.G., Katta H., Cumpian A.M., Gong L., Caetano M.S. et al. T-helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014; 111(15): 5664-9. DOI:10.1073/pnas.1319051111.
6. Mao Q., Jiang F., Yin R., Wang J., Xia W., Dong G. et al. Interplay between the lung microbiome and lung cancer. *Cancer Letters*. 2018; 415: 40-8. DOI:10.1016/j.canlet.2017.11.036.
7. Klindworth A., Priesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(1): e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
8. Yang J., Mu X., Wang Y., Zhu D., Zhang J., Liang C. et al. Dysbiosis of the Salivary Microbiome Is Associated With Non-smoking Female Lung Cancer and Correlated With Immunocytochemistry Markers. *Frontiers in oncology*. 2018; 8: 520. DOI:10.3389/fonc.2018.00520.
9. Herbst R.S., Heymach J.V., Lippman S.M. Lung cancer. *New Engl. J. Med.* 2008; 359(13): 1367-80. DOI:10.1056/NEJMra0802714.
10. Pauly J.L., Paszkiewicz G. Cigarette smoke, bacteria, mold, microbial toxins, and chronic lung inflammation. *J. Oncol.* 2011; 2011: 819129. DOI:10.1155/2011/819129.
11. Gomes S., Cavadas B., Ferreira J.C., Marques P.I., Monteiro C., Sucena M. et al. Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 12838. DOI:10.1038/s41598-019-49195-w.
12. Huang D., Su X., Yuan M., Zhang S., He J., Deng Q. et al. The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology. *Am. J. Cancer Res.* 2019; 9(9): 2047-63.
13. Peters B.A., Hayes R.B., Goparaju C., Reid C., Pass H.I., Ahn J. The Microbiome in Lung Cancer Tissue and Recurrence-Free Survival. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2019; 28(4): 731-40. DOI:10.1158/1055-9965.EPI-18-0966.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Пичугова С.В.^{1,2}, Розанова С.М.^{1,2}, Бейкин Я.Б.^{1,2}**ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИОСПЕРМИИ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМОГРАММЫ У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ**¹ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, Россия;²ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», 620144, Екатеринбург, Россия

Инфекционная этиология является причиной около 15% случаев мужского бесплодия. И если инфекции, передающиеся половым путём, достаточно легко диагностируются, то роль бессимптомной бактериоспермии в формировании infertility у мужчин, особенно у подростков на фоне имеющейся патологии репродуктивной сферы (варикоцеле), остается недостаточно изученной. При микробиологическом исследовании в эякуляте подростков выявлены следующие виды бактерий: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium munitissimum*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*. Бактерии в эякуляте обнаружены при выполнении спермограммы и электронно-микроскопического исследования сперматозоидов. При обильном росте микроорганизмов в монокультуре или ассоциации двух микроорганизмов, представленных в умеренном количестве, во всех случаях выявлены нарушения подвижности сперматозоидов, повышение вязкости эякулята, наличие лейкоцитов в семенной жидкости, на ультраструктурном уровне зафиксированы повреждения хроматина, акросомы, митохондрий, что может свидетельствовать об активной инфекции. При обнаружении бактериальной микрофлоры в небольшом и умеренном количестве (<10 КОЕ/мл) патологические изменения эякулята не наблюдались. Микрофлора эякулята обследованных подростков представлена грамположительной микрофлорой. Одновременное исследование пробы эякулята культуральным методом, выполнение спермограммы и ЭМИС позволило повысить выявляемость бактериоспермии. Опportunистические патогены при обильном росте или их различных ассоциациях могут служить фактором развития патоспермии. Отличить активную инфекцию от комменсальной микрофлоры или контаминации образца можно не только по наличию бактерий в эякуляте и их количественному учёту, но и по степени повреждения функции сперматозоидов и патологическим изменениям параметров эякулята, комбинируя методы диагностики. Наиболее часто при наличии бактерий в эякуляте диагностирована астенозооспермия.

Ключевые слова: бактериоспермия; подростки; варикоцеле; эякулят, сперматозоиды; мужское бесплодие.

Для цитирования: Пичугова С.В., Розанова С.М., Бейкин Я.Б. Диагностика бактериоспермии и ее влияние на показатели спермограммы у подростков с варикоцеле. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (8): 463-470.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-463-470>

Для корреспонденции: Пичугова Светлана Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунопатофизиологии, зав. лаб. электронной микроскопии КДЦ; e-mail: ekb-lem@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № 122020900136-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.03.2022

Принята к печати 20.03.2022

Опубликовано 15.08.2022

Pichugova S.V.^{1,2}, Rozanova S.M.^{1,2}, Beikin Ya.B.^{1,2}

DIAGNOSIS OF BACTERIOSPERMIA AND ITS EFFECT ON SPERMOGRAM PARAMETERS IN ADOLESCENT WITH VARICOCELE¹Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 620049, Yekaterinburg, Russia;²State Autonomous Institution of Health of the Sverdlovsk Region "Clinical and Diagnostic Center of the city of Yekaterinburg", 620144, Yekaterinburg, Russia

Infectious etiology is the cause of about 15% of cases of male infertility. And if sexually transmitted infections are easily diagnosed, the role of asymptomatic bacteriospermia in the formation of infertility in men, and especially in adolescents against the background of the existing pathology of the reproductive sphere (varicocele), remains insufficiently studied. A microbiological study in the ejaculate of adolescents revealed the following types of bacteria: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium munitissimum*, *Streptococcus anginosus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*. Bacteria in the ejaculate were also detected during semen analysis and electron microscopic examination of spermatozoa. With abundant growth of microorganisms in a monoculture or an association of two microorganisms present in a moderate amount, in all cases, violations of sperm motility, an increase in the viscosity of the ejaculate, the presence of leukocytes in the seminal fluid were detected, and damage to the chromatin, acrosome and mitochondria was recorded at the ultrastructural level, which may indicate active infection. When bacterial flora was detected in a small and moderate amount (<10 CFU/ml), no pathological changes in the ejaculate were observed. The microflora of the ejaculate of the examined adolescents is represented by gram-positive microflora. Simultaneous study of the ejaculate sample by bacteriological seeding, the performance of spermogram and EMIS allowed to increase the detection of bacteriospermia. Opportunistic pathogens with abundant growth or their various combinations can serve as a factor in the development of pathospermia. It is possible to distinguish an active infection from commensal microflora or sample contamination not only by the presence of bacteria in the ejaculate and their quantitative accounting, but also by the degree of damage to the function of spermatozoa and pathological changes in the parameters of the ejaculate, by combining diagnostic methods. Most often, in the presence of bacteria in the ejaculate, asthenozoospermia is diagnosed.

Key words: bacteriospermia; adolescents; varicocele; ejaculate; spermatozoa; male infertility.

For citation: Pichugova S.V., Rozanova S.M., Beikin Ya.B. Diagnosis of bacteriospermia and its impact on spermogram parameters in adolescents with varicocele. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 463-470 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-463-470>

For correspondence: Pichugova S.V., Candidate of Medical Sciences, senior researcher, laboratory of immunopathophysiology; e-mail: ekb-lem@mail.ru

Information about authors:

Pichugova S.V., <https://orcid.org/0000-0001-7983-9906>;

Rozanova S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8668-392X>;

Beikin Ya.B., <https://orcid.org/0000-0001-8622-1602>.

Acknowledgment. The work was carried out within the framework of the state task of the Institute of Physics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (subject No. 122020900136-4).

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

Received 03.03.2022

Accepted 20.03.2022

Published 15.08.2022

Введение. Во всем мире в последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция к увеличению количества бесплодных пар и нарастанию мужского фактора в нарушении репродуктивной функции [1-4]. Многие патологические процессы репродуктивной сферы мужчин начинают формироваться уже в раннем детстве или в подростковом периоде и одним из таких заболеваний является варикоцеле, которое развивается в результате варикозного расширения вен семенного канатика и является наиболее частой причиной мужского бесплодия [5-8]. Негативное влияние варикоцеле на тестикулярную ткань складывается из развивающейся в результате нарушения оттока венозной крови ишемии, гипоксии, гипертермии, что ведёт к нарушению сперматогенеза, снижению синтеза тестостерона, развитию инфертильности [8-13]. Дополнительную роль в формировании бесплодия при варикоцеле могут играть другие факторы, напрямую не связанные с патогенезом варикоцеле, но усугубляющие патоспермию. Таким фактором может являться бактериоспермия, причём инфекционная этиология вызывает около 15% случаев мужского бесплодия [1, 14]. Инфекции, передающиеся половым путём, имеют, как правило, выраженную клиническую картину, достаточно легко диагностируются и роль таких микроорганизмов в патологическом влиянии на сперматозоиды хорошо известна, поскольку более ранние исследования бактерий в эякуляте сосредоточены на обнаружении, идентификации и определении воздействия на параметры спермы облигатных патогенов [2, 3, 15-20].

Сперма не является стерильной и может содержать большое количество микроорганизмов, которые могут быть комменсалами или контаминантами [15, 17, 20-22]. До сих пор не известно, связан ли микробиом спермы с мужской фертильностью или качеством спермы [23]. Поскольку многие микроорганизмы, обнаруживаемые в эякуляте, являются условно-патогенными (УПМ) для доказательства их участия в патологическом процессе недостаточно только определения их присутствия в сперме [17]. Некоторыми авторами утверждается, что бессимптомная бактериоспермия может являться причиной бесплодия [24]. Предполагается, что фертильность при наличии бактерий в эякуляте может быть нарушена разными механизмами и на разных уровнях: развитие воспаления, дисфункция добавочных желез и непроходимость эпидидимиса, непосредственное действие на сперматозоиды (фрагментация ДНК, нарушение акросомной реакции, повреждение митохондрий, снижение

прогрессивной подвижности), нарушение сперматогенеза путём прямой конкуренции за питательные вещества, производство бактериями токсических промежуточных продуктов метаболизма или эндотоксинов, изменение физико-химических параметров эякулята, иммуноопосредованное действие с появлением антиспермальных антител (АСАТ) [17-19, 22, 25-33]. Убедительные доказательства, указывающие на то, что бессимптомная бактериоспермия может служить этиопатогенетическим фактором, способным оказать негативное влияние на качество эякулята и стать причиной мужского бесплодия отсутствуют и сложно оценить влияние бессимптомной инфекции на фертильность [2, 18, 27, 33, 34].

Учитывая обследуемый контингент, предполагается, что подростки ещё не получают микроорганизмы посредством половых контактов, о чём свидетельствует отсутствие клинических проявлений заболеваний передающихся половым путём, предоставляется возможность определения влияния на фертильные свойства эякулята бессимптомной бактериоспермии, обусловленной, как правило, УПМ [15, 19, 35].

Поскольку клиническое значение бессимптомной бактериоспермии остается неясным, а выявление бактерий в сперме без оценки параметров эякулята не даёт представления о степени повреждения сперматозоидов, необходима комплексная оценка не только наличия бактерий в эякуляте, но и изменений показателей спермограммы.

Цель исследования: выявить частоту встречаемости бактериоспермии у подростков с левосторонним варикоцеле, оценить видовой состав бактерий в эякуляте, определить патологические изменения параметров эякулята при бактериоспермии.

Материал и методы. Выполнено нерандомизированное когортное наблюдательное сравнительное неинтервенционное исследование на базе ГАУЗ СО «КДЦ». Критерии включения: возраст 17 лет, левостороннее варикоцеле. Критерии исключения: наличие признаков инфекционно-воспалительного процесса уrogenитального тракта, азооспермия, отказ от исследования. Исследованы эякуляты у 100 подростков с левосторонним варикоцеле и у 30 подростков без варикоцеле в возрасте 17 лет. Все обследуемые и их законные представители дали информированное согласие на участие в исследовании. ВОЗ до сих пор не разработала руководящих принципов по показаниям для выполнения бактериологического исследования эякулята [31]. Принятый стандарт оценки

микробиома мужских половых путей использует культуральный метод [17, 18, 36]. После предварительного мочеиспускания образцы спермы собирали путём мастурбации после 3-5 дней воздержания. Перед сбором эякулята обследуемым даны инструкции о необходимости выполнения процедур для предотвращения контаминации образцов. Пациенты должны помыть руки и пенис с мылом, сперма эякулировалась в стерильный контейнер [15, 28,37].

Культуральный метод. Для первичного посева методом истощающего мазка материал засеивали стерильной бактериологической петлёй на кровяно-дрожжевой и шоколадный агар. Культивировали при 35° С. Для создания анаэробных условий шоколадный агар помещали в анаэрогат. Через 16-18 ч чашки просматривали и при отсутствии роста выдерживали до 48 часов. Оценку выросших колоний проводили полуколичественным методом с оценкой по крестам (табл. 1).

Для видовой идентификации использован метод время-пролётной масс-спектрометрии, позволяющий проводить протеомный анализ с предварительной деградацией лазером. Исследования выполнены на масс-спектрометре MicroFlex LT Maldi-ToF (Bruker, Германия). Колонию вносили в ячейку мишени, тщательно растирали, просушивали и наносили матрикс. Подготовленный образец подвергали воздействию лазера и учитывали показания.

Оценку параметров эякулята и структуры сперматозоидов исследовали методом спермограммы и электронно-микроскопическим исследованием сперматозоидов (ЭМИС).

Спермограмма выполнена в соответствии со стандартами 5-й редакции ВОЗ, опубликованной в 2010 г. [40]. При выполнении спермограммы оценивали такие параметры эякулята, как объём спермы (мл), концентрация сперматозоидов (млн/мл), общее количество сперматозоидов (млн), кислотность, вязкость, наличие слизи, агрегации, агглютинации, лейкоцитов, амилоидных телец, прогрессивная подвижность, общая подвижность, морфология сперматозоидов.

Для ЭМИС эякулят фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, после чего образец центрифугировали и полученный осадок помещали для последующей дофискации в 1% раствор 4-х окиси осмия. Затем образец проводили через спирты возрастающей концентрации и полимеризовали в аралдитовой смоле при температуре 60° С. Ультратонкие срезы получали на ультратоме Leica EM UC6, контрастировали цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе Morgagni 268 при ускоряющем напряжении 70 киловольт. Строение сперматозоидов оценивали на продольных и поперечных срезах по следующим параметрам: форма ядра и состояние

хроматина (степень компактизации, наличие вакуолей и очагов деструкции), наличие акросомы, её локализация, размер и состояние, структура центриолей и аксонемы (количественные и качественные характеристики дуплетов, денеиновых ручек), структура и локализация митохондрий, плотных фибрилл, волокон фиброзного слоя, наличие цитоплазматической капли и её локализация.

Статистический анализ выполнен с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). С помощью критерия χ^2 определена оценка нормальности распределения. В виде средних арифметических значений и стандартных отклонений представлены количественные показатели ($M \pm SD$). Коэффициент Стьюдента применялся при оценке достоверности различий, для установления корреляционных взаимосвязей показателей использован линейный коэффициент корреляции Пирсона. Различия результатов считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Культуральным методом на питательных средах у подростков с варикоцеле и без варикоцеле в эякуляте обнаружены следующие виды бактерий (табл. 2).

Частота выявления бактерий в эякуляте культуральным методом одинакова у подростков обеих групп. У подростков с варикоцеле статистически значимо чаще выявлен умеренный рост *C. glucuronolyticum* по сравнению с подростками без варикоцеле. Бактерии в монокультуре выявлены в эякуляте обследуемых обеих групп, ассоциации бактерий – только у подростков с варикоцеле. При выполнении спермограммы и ЭМИС помимо оценки параметров эякулята и морфологии сперматозоидов обнаружены бактерии.

Подростки с варикоцеле. Наиболее выраженные изменения показателей эякулята выявлены у трёх человек, у которых при бактериологическом исследовании определён обильный рост *Staphylococcus haemolyticus* и *Streptococcus anginosus*, при этом в спермограмме у всех троих определена астенозооспермия со снижением всех видов подвижности. Из них в одном случае нарушение подвижности сочеталось с олигозооспермией и ещё в одном – с олиготератозооспермией. Бактерии обнаружены в спермограмме, при этом отмечались признаки воспалительной реакции – наличие сегментоядерных нейтрофилов, тяжёлой слизи. При ЭМИС в сперматозоидах обнаружены повреждения хроматина, акросомы в головках и митохондрий в жгутиках, бактерии.

Снижение прогрессивной подвижности сперматозоидов зафиксировано в шести случаях, когда культуральным методом исследования эякулята выявлен обильный рост *C. glucuronolyticum*, при смешанном росте *S. epidermidis* и *C. minitissimum*, сопровождающийся вискозипатией эякулята. Методом ЭМИС обнаружены повреждения

Таблица 1

Полуколичественный учёт колоний [38, 39]

Рост на пластинчатых средах	Ответ
1-5 колоний	Единичные колонии
Рост в первом квадрате (скудный рост во втором квадрате не учитывается)	«+», скудный рост
Рост во втором квадрате (скудный рост в третьем квадрате не учитывается)	«++», умеренный рост
Рост в третьем квадрате (скудный рост в четвёртом квадрате не учитывается)	«+++», обильный рост
Рост в четвёртом квадрате	«++++», обильный рост

митохондрий и акросомы, только в трёх случаях выявлены бактерии. В тех случаях, когда бактерии методом электронной микроскопии не обнаружены, при посеве диагностирован скудный рост микроорганизмов. Это связано с различной чувствительностью методов: при микроскопии бактерии определяют при их титре $\geq 10^5$ КОЕ/мл, культуральным методом – при $\geq 10^2$ КОЕ/мл.

В шести случаях выявлен скудный рост *C. glucuronolyticum*, при этом в спермограмме диагностирована нормозооспермия. Бактерии в спермограмме обнаружены в трёх случаях. Методом ЭМИС в этих случаях определена типичная ультраструктура сперматозоидов, бактерии не обнаружены.

Умеренный рост выявлен у нескольких видов бактерий: *C. glucuronolyticum* (6 случаев, статистически значимое отличие от подростков без варикоцеле), *E. faecalis* (3 случая), ассоциация *E. faecalis* и *E. coli* (3 случая). В трёх случаях, когда диагностирована *C. glucuronolyticum*, определена и астенозооспермия, в остальных случаях определена олигоспермия при нормальных остальных показателях. При астенозооспермии при ЭМИС обнаружены повреждения митохондрий, обилие слизи, единичные сегментоядерные нейтрофилы и бактерии. В остальных пробах ультраструктура митохондрий без особенностей, но обнаружены тяжёлая слизь, единичные сегментоядерные нейтрофилы и клетки плоского эпителия с адгезированными на них бактериями. В случаях наличия только *E. faecalis* или ассоциации *E. faecalis* и *E. coli* диагностирована нормозооспермия, но при ассоциации бактерий единичные микроорганизмы обнаружены при ЭМИС.

Методом спермограммы (при отрицательном результате посева) бактерии в небольшом количестве обнаружены у четырёх человек, в умеренном количестве у двух человек. Вероятно, обнаружены некультивируемые формы в титре $>10^5$ КОЕ/мл. При этом во всех этих случаях отмечается астенозооспермия, причём у двух человек с умеренной бактериоспермией снижены все категории подвижности, обнаружены лейкоциты в эякуляте. У остальных четырёх человек зафиксирована

олигоспермия и снижение категории подвижности «А». При ЭМИС во всех этих случаях бактерии не обнаружены, но определено повреждение митохондрий, наличие тяжёлой слизи, сегментоядерные нейтрофилы выявлены только у двух человек, что и в спермограмме.

Методом ЭМИС бактерии в эякуляте обнаружены у 12 человек, причём у 6-ти человек обнаружены единичные бактерии или отмечается их адгезия на эпителиальных клетках, что может расцениваться как контаминация образца эякулята бактериями кожных покровов (см. рисунок, а). При этом диагностирована нормозооспермия как в спермограмме, так и при электронно-микроскопическом исследовании эякулята. В остальных 6-ти случаях в спермограмме определена астенозооспермия, сопровождающаяся снижением всех видов подвижности сперматозоидов, вискозипатия эякулята. При ЭМИС обнаружены повреждения акросомы, митохондрий, наличие крупных колоний бактерий (см. рисунок, б) и сегментоядерных нейтрофилов.

В 3-х случаях бактерии в эякуляте обнаружены при выполнении спермограммы и ЭМИС, результаты бактериологического исследования отрицательны. При этом в спермограмме диагностирована нормозооспермия и небольшое количество бактерий. При ЭМИС выявлена типичная структура сперматозоидов, единичные бактерии адгезированы на клетках плоского эпителия.

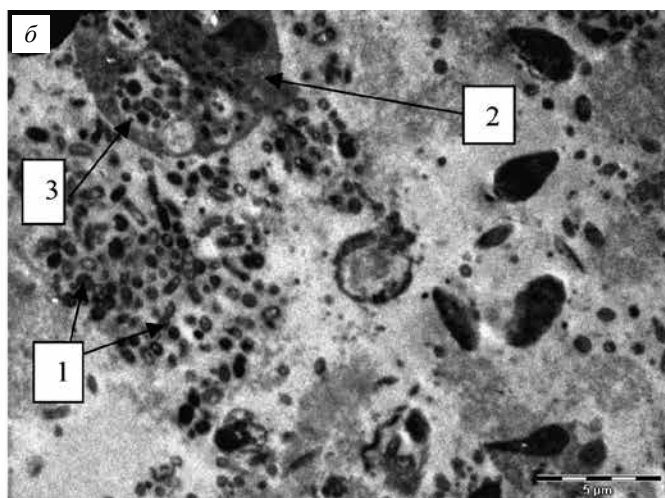
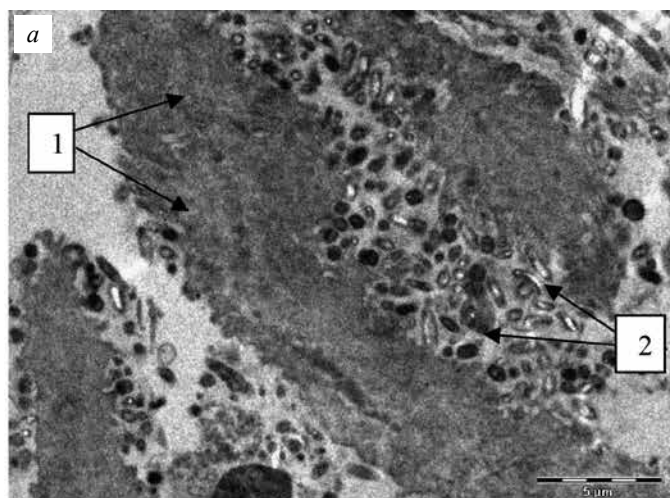
Подростки без варикоцеле. У четырёх человек в посеве эякулята выявлен скудный рост *C. glucuronolyticum*, при этом только в одном из этих случаев в спермограмме зафиксировано снижение поступательного движения сперматозоидов, в остальных трёх случаях выявлена олигоспермия, все остальные параметры эякулята в пределах нормы. Методом ЭМИС диагностирована нормозооспермия. В спермограмме и при электронно-микроскопическом исследовании эякулята бактерии в этих случаях не обнаружены.

Скудный рост *S. epidermidis* определён у двух человек. В спермограмме этих подростков диагностирована нормозооспермия, но при этом выявлены единичные лейкоциты и бактерии. При ЭМИС определена типич-

Таблица 2

Бактерии, обнаруженные в эякуляте подростков

Вид бактерий	Характер роста	Частота встречаемости	
		Подростки с варикоцеле, n=100	Подростки без варикоцеле, n=30
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> (Гр+ палочки)	«+» «++» «+++»	6(6%) 6(6%)* 3(3%)	4(13,3%) - -
<i>Enterococcus faecalis</i> (Гр+кокки)	«++»	3(3%)	-
<i>Escherichia coli</i> (Гр-палочки)	«++»	-	2(6,6%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Гр+кокки)	«+»	-	2(6,6%)
		Mixt	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Гр+кокки) / <i>Streptococcus anginosus</i> (Гр+кокки)	«+++»/«+++»	3(3%)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Гр+кокки)/ <i>Corynebacterium minutissimum</i> (Гр+ палочки)	«+»/ед. колонии	3(3%)	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (Гр+кокки)/ <i>Escherichia coli</i> (Гр-палочки)	«++»/«+++»	3(3%)	-
Итого:		27(27%)	8(26,6%)



Бактерии в эякуляте.

a – фрагмент клетки плоского эпителия (1), адгезия бактерий (2). Ув.х 3500; *б* – колония бактерий (1), сегментоядерный нейтрофил (2), фагоцитоз бактерий (3). Ув. х 2800.

Таблица 3

Частота выявления бактериоспермии разными методами

Метод диагностики бактериоспермии	Частота выявления бактериоспермии	
	Подростки с варикоцеле, <i>n</i> =100	Подростки без варикоцеле, <i>n</i> =30
Посев эякулята	9	4
Спермограмма	6	2
ЭМИС	12	-
Посев эякулята и спермограмма	3	2
Посев эякулята и ЭМИС	12	-
Спермограмма и ЭМИС	3	-
Посев эякулята, спермограмма, ЭМИС	3	2
Всего	48(48%)	10(33,3%)

Таблица 4

Патологические изменения показателей спермограммы при бактериоспермии

Вариант заключения спермограммы	Частота выявления	
	Подростки с варикоцеле, <i>n</i> =100	Подростки без варикоцеле, <i>n</i> =30
Нормозооспермия	24 (24%)	7 (23,3%)
Астенозооспермия	22(22%)	3 (10%)
Олигоастенозооспермия	1(1%)	-
Олиготератозооспермия	1(1%)	-
Олигоспермия	10 (10%)	4(13,3%)
Вискозипатия	18 (18%)*	2(6,6%)*

Примечание. * – достоверно значимые различия ($p \leq 0,05$).

ная ультраструктура сперматозоидов, единичные бактерии адгезированы на клетках плоского эпителия.

Ещё в двух случаях на питательных средах выявлены *E. coli*, умеренный рост. При оценке параметров эякуля-

та в спермограмме диагностирована астенозооспермия, вискозипатия, при ЭМИС – повреждение митохондрий в среднем отделе жгутика, при этом бактерии в эякуляте этими методами не обнаружены. Ещё у двух подростков в спермограмме в небольшом количестве обнаружены бактерии, при этом зафиксирована нормозооспермия и в одном случае олигоспермия. На ультраструктурном уровне определена нормозооспермия, бактерии при этом виде исследования не обнаружены, также, как и при посеве в этих двух случаях. Частота диагностики бактериоспермии разными методами представлена в табл. 3.

Применение нескольких методов диагностики бактериоспермии существенно повысило выявляемость микрофлоры в эякуляте у подростков обеих групп.

Патологические изменения показателей спермограммы при наличии бактерий представлены в табл. 4 (следует учитывать возможность комбинации различных видов патологических изменений параметров эякулята). При этом результаты оценки сперматозоидов методом ЭМИС не учитывались, так как они носят вспомогательный характер более детальной оценки патологических изменений сперматозоидов, а не всех параметров эякулята.

У подростков с варикоцеле в большом количестве случаев выявлены различные варианты патологических изменений параметров эякулята, но статистически значимо чаще диагностирована только вискозипатия эякулята.

Обсуждение. По результатам бактериологического исследования эякулята у подростков не обнаружены патогенные микроорганизмы, выявлены следующие виды бактерий: *E. coli*, *E. faecalis*, относящиеся к приоритетным уропатогенам [38,41], *C. glucuronolyticum*, *C. minutissimum*, *S. anginosus*, относящиеся к УПМ, в том числе урогенитального тракта мужчин [42–44]. Обнаружен *S. epidermidis*, являющийся, преимущественно, сапрофитной микрофлорой, но может быть и УПМ в определённых случаях [42]. Роль таких микроорганизмов как *S. haemolyticus* в возможности вызвать инфекцию урогенитального тракта недостаточно изучена [43].

Наиболее выраженные изменения сперматозоидов выявлены при наличии в эякуляте *S. haemolyticus*, *S. anginosus*, *C. glucuronolyticum*, когда отмечался обильный

рост этих микроорганизмов на питательных средах, при ассоциации *S. epidermidis* и *C. minutissimum*, хотя зафиксирован их скудный рост. В спермограмме в этих случаях диагностирована астенозооспермия, олигозооспермия, признаки воспаления (наличие сегментоядерных нейтрофилов, тяжёлой слизи). При ЭМИС обнаружены повреждения хроматина и акросомы в головках сперматозоидов, набухание митохондрий, деструкция крист в среднем отделе жгутиков.

Астенозооспермия зафиксирована и в случаях умеренного роста *C. glucuronolyticum*.

Наличие УПМ *E. coli* и *E. faecalis* даже при умеренном росте не привели к патологическим изменениям параметров эякулята у подростков с варикоцеле, в то время как, у подростков без варикоцеле диагностировано нарушение подвижности сперматозоидов.

Наиболее часто при бактериоспермии диагностируется нарушение подвижности сперматозоидов, что может быть обусловлено прямым цитотоксическим действием на сперматозоиды продуктов метаболизма бактерий, и изменением в результате этого физико-химических свойств эякулята, в частности, изменением уровня pH семенной жидкости, снижение или повышение которого оказывает негативное воздействие на сперматозоиды. Подвижность сперматозоидов может быть нарушена в результате контакта между пиллями бактерий и жгутиками сперматозоидов за счёт усиления их адгезионных свойств, обусловленных активацией рецепторов маннозы на поверхности жгутиков [21, 35]. К нарушению подвижности сперматозоидов может вести и повышенное образование агглютинирующих антиспермальных антител, опосредованное перекрёстной реактивностью к антигенам бактерий и сперматозоидов [3, 25, 41]. Эндотоксины бактерий способны запускать экспрессию Toll-подобных рецепторов на мембранах сперматозоидов, что на фоне избыточной продукции АФК (активных форм кислорода) при воспалении, активации запрограммированной гибели клеток и усилении перекисного окисления липидов приводит к утечке цитохромов, активации киназ и накоплению мономеров YL-1, вызывающих деполяризацию мембран митохондрий [29]. Адгезия бактерий, воздействие их токсинов может приводить к разрыву мембран митохондрий как наиболее уязвимых, повреждению ядерной мембраны, мембраны акросомы, что и было диагностировано при выполнении ЭМИС.

Олигозооспермия и олигоспермия, диагностированные в ряде случаев, вероятнее всего не связаны с наличием бактерий в эякуляте, а обусловлены ещё не установленными в полной мере сперматогенезом и функцией добавочных половых желез у подростков. О нарушении сперматогенеза бактериями и их токсинами могло бы свидетельствовать наличие большого количества аномальных форм сперматозоидов, как результат повреждения сперматогенного эпителия в семенных канальцах. В нашем исследовании сперматозоиды, как правило, имеют нормальную морфологию, а выявленные изменения затрагивают правильно сформированные органеллы. Скорее всего, негативное влияние бактериоспермии на сперматозоиды происходит в дистальных, нестерильных отделах урогенитального тракта.

Маркёром инфекционного процесса и воспалительной реакции любой локализации служит, как правило, наличие лейкоцитов [2, 18, 20, 35]. В проведённом исследовании лейкоциты выявлены в спермограмме и при ЭМИС, но не во всех случаях они отражали наличие

инфекционного процесса. Количество сегментоядерных нейтрофилов в семенной жидкости, помимо инфекции, может увеличиваться при курении, приёме лекарственных средств, физической активности, при варикоцеле [26]. Лейкоцитоспермия не может являться информативным прогностическим тестом, особенно в случаях бессимптомной бактериоспермии.

Повышение количества слизи в эякуляте может рассматриваться в качестве показателя присутствия бактерий и обусловленной ими воспалительной реакции, приводящей к дисфункции семенных пузырьков и предстательной железы. Вискозипатия эякулята диагностирована в 18% случаев у подростков с варикоцеле и в статистически значимо меньшем количестве случаев у подростков без варикоцеле при бактериоспермии. Чаще всего повышение вязкости эякулята отмечено в случаях выраженной бактериоспермии. У подростков вискозипатия эякулята может быть обусловлена неустановившейся функцией вспомогательных желез, о чем свидетельствует наличие повышенного количества слизи, и незначительным количеством бактерий без признаков воспалительной реакции.

Можно предположить, что выявление изменений параметров эякулята при наличии бактерий может свидетельствовать о бессимптомной инфекции, в то время как присутствие даже УПМ без изменения сперматозоидов может трактоваться как контаминация образца. Выявление патологических изменений в спермограмме при наличии УПМ, позволяет предположить, что патологический процесс обусловлен повышенным количеством бактерий (как правило, в этих случаях наблюдался обильный рост микроорганизмов) или ассоциацией различных видов бактерий, что может оказывать более неблагоприятное влияние на параметры спермы.

Необходимо учитывать, что простое присутствие бактерий в эякуляте уже может привести к ухудшению его качества, а хроническая бессимптомная инфекция может оказывать длительное негативное влияние на сперматогенез, проходимость семявыносящих и семявыбрасывающих протоков и инициировать формирование инфертильности.

У подростков с варикоцеле, сперматогенез изначально находится в неблагоприятных условиях, а наличие бактерий в эякуляте делает его ещё более уязвимым.

Выявление бактерий в эякуляте должно быть частью диагностики, и, возможно, в ряде случаев требовать лечения с целью профилактики мужского бесплодия уже в подростковом возрасте.

Заключение. Бактериологическим методом установлена высокая распространённость в эякуляте грамположительных кокков, относящихся к нормальной микрофлоре кожи.

Включение культуральной диагностики в комплекс исследования эякулята позволит значительно повысить выявление бактериоспермии.

УПМ при обильном росте или их различных комбинациях могут служить фактором развития патоспермии.

Отличить активную инфекцию от комменсальной микрофлоры или контаминации образца можно не только по наличию бактерий в эякуляте и их количеству, но и по степени повреждения функции сперматозоидов и патологическим изменениям параметров эякулята при использовании различных методов диагностики.

Наиболее часто при наличии бактерий в эякуляте диагностирована астенозооспермия.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 8, 12-32, 35,36, 38-44
см. REFERENCES)

4. Белый Л.Е. Оплодотворяющая способность спермы у лиц с бессимптомной бактериоспермией. *Академический журнал Западной Сибири*. 2015; 4(59): 65-6.
5. Аполихин О.И., Москалева Н.Г., Комарова В.А. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2015; 4:4-14.
6. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Кастрикин Ю.В. Варикоцеле у детей и подростков. *Лечение и профилактика*. 2017; 21(1):53-6.
7. Кодирова А.М., Негматова М.Н. Полиэтиологичность мужского бесплодия. Медицинская культура. Материалы XIX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке», Москва; 2017:138-9.
9. Жиборев Б.Н. Варикоцеле, мужской гипогонадизм и репродуктивный прогноз. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П.Павлова*. 2008; 1:1-8.
10. Комарова С.Ю., Цап Н.А. Пути снижения риска репродуктивных потерь у детей с варикоцеле. *Медицинская наука и образование на Урале*. 2017; 1:98-101.
11. Кучеров В.А., Кравцов Ю.А., Матвеев С.В. Возможности и перспективы интраоперационного исследования половых гормонов при варикоцеле. *Уральский медицинский журнал*. 2018; 5: 102-7.
33. Годовалов А.П. Опыт изучения образцов эякулята инфертильных мужчин с бессимптомной бактериоспермией. *Электронный научно-образовательный Вестник «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2015; 17(11): 19-23.
34. Вавилов Н.В., Степанов М.С., Бушкова Е.Ю. Окислительная модификация белков и микробный пейзаж эякулята при мужском бесплодии. *Международный студенческий вестник*. 2016; 6:34.
37. Семёнов А.В., Пацановская Г.М. К вопросу о влиянии бактериоспермии на качество спермы. *Паллиативная медицина и реабилитация*. 2008; 4:29-33.
9. Zhiborev B.N. Varicocele, male hypogonadism and reproductive prognosis. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akad. I.P. Pavlova*. 2008; 1: 1-8. (in Russian)
10. Komarova S.Yu., Tsap N.A. Ways to reduce the risk of reproductive loss in children with varicocele. *Meditinskaya nauka I obrazovanie na Urale*. 2017; 1: 98-101. (in Russian)
11. Kucherov V.A., Kravtsov Yu.A., Matveev S.V. Possibilities and prospects of intraoperative study of sex hormones in varicocele. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 5: 102-7. (in Russian)
12. Cho C.L., Esteves S.C., Agarwal A. Indications and outcomes of varicocele repair. *Panminerva Med*. 2019; 2(61): 152-63. DOI: 10.23736/S0031-0808.18.03528-0.
13. Dabaja A.A., Goldstein M. When is a varicocele repair indicated: the dilemma of hypogonadism and erectile dysfunction? *Asian J. Androl*. 2016; 18(2): 213-6. DOI: 10.4103/1008-682X.169560.
14. Ma Z., Li L. Semen Microbiome Biogeography: An Analysis Based on a Chinese Population Study. *Front Microbiol*. 2018; 9: 3333. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03333.
15. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
16. Stojanov M., Baud D., Greub G., N. Vulliamoz N. Male infertility: the intracellular bacterial hypothesis. *New Microbes New Infect*. 2018; 26: 37–41. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.08.012.
17. Pergialiotis V., Karampetsou N., Perrea D. N., Konstantopoulos P., Daskalakis G. The Impact of Bacteriospermia on Semen Parameters: A Meta-Analysis. *J. Family Reprod. Health*. 2018; 12(2): 73-83.
18. Solomon M., Henkel R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections. *Indian. J. Urol*. 2017; 33(3): 188-93. DOI: 10.4103/iju.IJU_407_16.
19. Calogero A.E., Condorelli R.A., Russo G.I., Vignera S.L. Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed. Res. Int.*; 2017. Published online. DOI: 10.1155/2017/4650182.
20. Machen G.L., Bird E.T., Brown M.L., Ingalsbe D.A., Milaida M. East M.M. et al. Time trends for bacterial species and resistance patterns in semen in patients undergoing evaluation for male infertility. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent*. 2018; 31(2): 165-7. DOI: 10.1080/08998280.2018.1444298.
21. Štšepetova J., Baranova J., Simm J., Parm Ü., Rööp T., Sokmann S. et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2020; 18(1):3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
22. Pilatz A., Kilb J., Kaplan J., Fietz D., Hossain H., Schüttler C.G., Diemer T., Bergmann M., Domann E., Weidner W., Wagenlehner F., Schuppe H.C. High prevalence of urogenital infection/inflammation in patients with azoospermia does not impede surgical sperm retrieval. *Andrologia*. 2019; 51(10): e13401. DOI: 10.1111/and.13401.
23. Schoenmakers S., Steegers-Theunissen R., Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet. Med*. 2019; 12(3): 107-15. DOI: 10.1177/1753495X18775899.
24. Saxena P., Soni R., Randhawa V.S., Singh N. Can seminal IL-8 level be used as a marker of leukocytospermia and does it have any correlation with semen parameters in infertile couples? *J. Obstet. Gynaecol. India*. 2019; 69(5): 451-6. DOI: 10.1007/s13224-018-1188-3.
25. Fijak M., Pilatz A., Hedger M.P., Nicolas N., Bhushan S., Michel V., Tung K.S.K., Schuppe H.C., Meinhardt A. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum. Reprod. Update*. 2018; 24(4): 416-41. DOI: 10.1093/humupd/dmy009.
26. Ricci S., De Giorgi S., Lazzeri E., Luddi A., Piomboni P., De Leo V., Pozzi G. Impact of asymptomatic genital tract infections on *in vitro* Fertilization (IVF) outcome. *PLoS One*. 2018; 13(11): e0207684. DOI: 10.1371/journal.pone.0207684.
27. Esmailkhani A., Akhi M.T., Sadeghi J., Niknafs B., Bialvaei A.Z., Farzadi L., Safadel N. Assessing the prevalence of *Staphylococcus aureus* in infertile male patients in Tabriz, northwest Iran.

REFERENCES

1. Wang F., Yang W., Ouyang S., Yuan S. The Vehicle Determines the Destination: The Significance of Seminal Plasma Factors for Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(22): 8499. Published online 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13098-016-0192-y.
2. Damke E., Kurscheidt F. A., Irie M. M.T., Gimenes F., Conso-laro M. E. L. Male Partners of Infertile Couples With Seminal Positivity for Markers of Bacterial Vaginosis Have Impaired Fertility. *Am. J. Mens Health*. 2018; 12(6): 2104-15. DOI: 10.1177/1557988318794522.
3. Marques P.I., Gonçalves J.C., Monteiro C., Cavadas B., Nagir-naja L., Barros N., Barros A., Filipa Carvalho F., Lopes A. M., Seix-as S. Semen quality is affected by HLAclass I alleles together with sexually transmitted diseases. *Andrology*. 2019;7(6): 867-77. DOI: 10.1111/andr.12625.
4. Bely L.Ye. Fertilizing capacity of sperm in persons with asymp-tomatic bacteriospermia. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoy Sibiri*. 2015; 4 (59): 65-6. (in Russian)
5. Apolikhin O.I., Moskaleva N.G., Komarova V.A. The current de-mographic situation and problems of improving the reproductive health of the population of Russia. *Experimental'naya I klinicheskaya urologiya*. 2015; 4: 4-14. (in Russian)
6. Evdokimov V.V., Zakharikov S.V., Kastrikin Yu.V. Varicocele in children and adolescents. *Lechenie I profilaktika*. 2017; 21 (1): 53-6. (in Russian)
7. Kodirova A.M., Negmatova M.N. The polyethology of male infertil-ity. Medical culture. Materials of the XIX International Congress "Health and Education in the XXI Century". Moscow; 2017: 138-9. (in Russian)
8. Alkaram A., McCullough A. Varicocele and its effect on testoste-ron: implications for the adolescent. *Transl. Androl. Urol*. 2014; 3(4): 413-7. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2014.12.07.

- Int. J. Reprod. Biomed.* 2018; 16(7): 469-74. DOI: 10.29252/ijrm.16.7.469.
28. Silago V., Mukama Y., Haule A.L., Chacha F., Igenge J., Mushi M.F., Mshana S.E. Bacteriospermia, extended spectrum beta lactamase producing Gram-negative bacteria and other factors associated with male infertility in Mwanza, Tanzania: a need of diagnostic bacteriology for management of male infertility. *Afr. Health Sci.* 2020; 20(1): 4-13. DOI: 10.4314/ahs.v20i1.4.
29. Duracka M., Lukac N., Kacaniova M., Kantor A., Hleba L., Ondruska L., Tvrda E. Antibiotics Versus Natural Biomolecules: The Case of In Vitro Induced Bacteriospermia by *Enterococcus faecalis* in Rabbit Semen. *Molecules.* 2019; 24(23): e 4329. DOI: 10.3390/molecules24234329.
30. Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R., Crafa A., Calogero A.E., Condorelli R.A. The Relationship between Seminal Fluid Hyperviscosity and Oxidative Stress: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(3): 356. DOI: 10.3390/antiox10030356.
31. Jue J.S., Ramasamy R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Transl. Androl. Urol.* 2017; 6(5): 916-22. DOI: 10.21037/tau.2017.06.23.
32. Baud D., Pattaroni C., Vulliamoz N., Castella V., Marsland B.J., Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019; 10:234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
33. Godovalov A.P. Experience in studying ejaculate samples from infertile men with asymptomatic bacteriospermia. *Elektronnyi I obrazovatel'nyi vestnik "Zdorov'e I obrazovanie v XXI veke"*. 2015; 17 (11): 19-23. (in Russian)
34. Vavilov N.V., Stepanov M.S., Bushkova E.Yu. Oxidative modification of proteins and the microbial landscape of the ejaculate in male infertility. *Mezhdunarodnyi studencheskiy vestnik.* 2016; 6: 34. (in Russian)
35. Berjis K., Ghiasi M., Sangy S. Study of seminal infection among an infertile male population in Qom, Iran, and its effect on sperm quality. *Iran. J. Microbiol.* 2018; 10(2): 111-6.
36. Swanson G.M., Moskovtsev S., Librach C., Pilsner J.R., Godrich R., Krawetz S.A. What human sperm RNA-Seq tells us about the microbiome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020; 37(2): 359-68. DOI: 10.1007/s10815-019-01672-x.
37. Semenov A.V., Patsanovskaya G.M. On the question of the effect of bacteriospermia on sperm quality. *Palliativnaya meditsina I reabilitatsiya.* 2008; 4: 29-33. (in Russian)
38. Clinical microbiology procedures handbook. Amy L. Leber, ed. Department of Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio. Description: 4th ed. Washington, DC : ASM Press; 2016.
39. Miller J.M., Binnicker M.J., Campbell S., Carroll K.C., Chapin K.C. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clinical Infectious Diseases IDSA Guideline; 2018:67 Downloaded from <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/67/6/e1/5046039> by IDSA user on 16 October 2018.
40. WHO guidelines for the study and processing of human ejaculate. 5th ed. Transl. from English N.P. Makarov, L.F. Smoked, ed. Moscow: Publishing house Capital print; 2012.
41. Schuppe H.C., Pilatz A., Hossain H., Diemer T., Wagenlehner F., Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017; 114(19): 339-46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
42. Murray P.R., Barron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., White R.H. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003.
43. Gherardi G., Di Bonaventura G., Pompilio A., Savini V. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection. *Case report and review of the literature IDCases.* 2015; 2(2): 56-8.
44. Băncescu G., Băncescu A., Constantinescu M.V. Streptococcus anginosus group – brief characterization and its contribution to the brain abscess pathogenesis. *Stoma. Edu. J.* 2015; 2(2): 153-61.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Давидович Н.В., Галиева А.С., Оправин А.С., Гагарина Т.Ю., Малыгина О.Г., Лейхтер С.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А.

ВЗАИМОСВЯЗИ МАРКЕРНЫХ ПАРОДОНТОПАТОГЕНОВ С УРОВНЕМ СЕКРЕЦИИ ИММУННОГО КОМПОНЕНТА sCD_{14} ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА

ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет Минздрава России, 163000, г. Архангельск, Россия

Липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий является высокоактивным биологическим веществом: взаимодействие его с толл-лайк рецепторами-4 (TLR-4) клеток миелоидного ряда приводит к активации каскада воспалительных реакций, что сопровождается выбросом растворимого рецептора CD_{14} (sCD_{14}), который можно рассматривать не только как маркер активации клеток эндотоксином, но и как маркер микробной транслокации. Цель работы – оценка уровня секреции sCD_{14} в образцах отделяемого зубодесневого кармана при воспалительных заболеваниях пародонта и его взаимосвязь с маркерными пародонтопатогенами. Получены смывы зубодесневого кармана (88 образцов) пациентов с хроническим пародонтитом и интактным пародонтием. С помощью ИФА определяли содержание sCD_{14} в ходе ПЦР в режиме реального времени выделяли маркерные пародонтопатогены: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Candida albicans*. Выявлены различия в уровне секреции sCD_{14} по группам: при хроническом пародонтите его содержание в 8,5 раз выше, чем в группе контроля и составило $17,2 \pm 4,06$ нг/мл ($p=0,006$). Частота выявления генов пародонтопатогенных бактерий составила 89,3% у пациентов с пародонтитом и 31,25% в группе с интактным пародонтием. Интересная зависимость выявления пародонтопатогенных бактерий в группе пациентов с хроническим пародонтитом установлена в зависимости от содержания sCD_{14} . При высоких концентрациях растворимого корецептора выделялось большее количество пародонтопатогенных бактерий I и II порядка. При воспалительных заболеваниях пародонта изменяются процессы синтеза sCD_{14} , что, вероятно, обусловлено колонизацией пародонтопатогенных бактерий и действием их токсинов и факторов агрессии. Взаимосвязи маркерных пародонтопатогенов с уровнем секреции sCD_{14} и его влияние на структуру пародонтального индекса отражают сдвиги в процессах репаративной регенерации слизистой оболочки ротовой полости и регуляции местного иммунитета в ответ на микробную инвазию.

Ключевые слова: микробиота ротовой полости; sCD_{14} ; неспецифические факторы защиты; воспалительные заболевания пародонта; пародонтопатогенные бактерии.

Для цитирования: Давидович Н.В., Галиева А.С., Оправин А.С., Гагарина Т.Ю., Малыгина О.Г., Лейхтер С.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Взаимосвязи маркерных пародонтопатогенов с уровнем секреции иммунного компонента sCD_{14} при воспалительных заболеваниях пародонта. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (8): 471-475.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-471-475>

Для корреспонденции: Давидович Наталья Валерьевна, канд. мед. наук, доц. каф. клин. биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики; e-mail: nvdavidovich@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке «Внутреннего конкурса грантов для молодых ученых по приоритетным направлениям развития ФГБОУ ВО СГМУ г. Архангельск» № 162 от 05.02.2021, проект «Мониторинг формирования антибиотикорезистентности микробных биопленок полости рта и оптимизация патогенетических подходов в лечении воспалительных заболеваний пародонта».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.03.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 15.08.2022

Davidovich N.V., Galieva A.S., Opravin A.S., Gagarina T.Yu., Malygina O.G., Leikhter S.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A.

CORRELATION OF MARKER PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA WITH THE IMMUNE COMPONENT sCD_{14} SECRETION LEVEL IN INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

FSBEI HE Northern State Medical University (Arkhangelsk) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 163000, Arkhangelsk, Russia

*Lipopolysaccharide of the cell wall of gram-negative bacteria is a highly active biological substance: its interaction with toll-like receptors-4 (TLR-4) of myeloid cells leads to the activation of a cascade of inflammatory reactions, which is accompanied by the release of the soluble CD_{14} receptor (sCD_{14}), which can be considered not only as a marker of cell activation by endotoxin, but also as a marker of microbial translocation. The aim of the work was to assess the prognostic significance of the sCD_{14} level in the samples of the periodontal pocket in inflammatory periodontal diseases and the relationship of its secretion with marker periodontopathogens. For the study, washes were obtained from the periodontal pocket (88 samples in total) from patients with chronic periodontitis and intact periodontium. The sCD_{14} content was determined by ELISA; during real-time PCR, the marker periodontopathogens *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Candida albicans* were isolated. The study revealed differences in the level of sCD_{14} secretion by groups: in chronic periodontitis, its content was 8.5 times higher than in the control group and amounted to $17,2 \pm 4,06$ ng/ml ($p=0,006$). The frequency of detecting genes of periodontal pathogenic bacteria was 89.3% in patients with periodontitis and 31.25% in the group with intact periodontium. An interesting dependence of the detection of periodontal pathogenic bacteria in the group of patients with chronic periodontitis was established depending on the content of sCD_{14} . Thus, at high concentrations of soluble coreceptor, a greater number of periodontopathogenic bacteria of the I and II orders were released. Thus, in inflammatory periodontal diseases, the processes of sCD_{14} synthesis change, which is probably due to the colonization of periodontal pathogenic*

bacteria and the action of their toxins and aggression factors. The relationship of marker periodontopathogens with the level of secretion of the immune component sCD₁₄ and its effect on the structure of the periodontal index reflect shifts in the processes of reparative regeneration of the oral mucosa and the regulation of local immunity in response to microbial invasion.

Key words: *oral microbiota; sCD₁₄; nonspecific protective factors; inflammatory periodontal diseases; periodontal pathogenic bacteria.*

For citation: Davidovich N.V., Galieva A.S., Opravin A.S., Gagarina T.Yu., Malygina O.G., Leikhter S.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. Correlation of marker periodontopathogenic bacteria with the immune component sCD₁₄ secretion level in inflammatory periodontal diseases. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 471-475 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-471-475

For correspondence: Davidovich Nataliya Valerievna, candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics; e-mail: nvdavidovich@gmail.com

Information about authors:

Davidovich N.V., https://orcid.org/0000-0002-6414-9870;
Galieva A.S., https://orcid.org/0000-0002-7037-7730;
Opravin A.S., https://orcid.org/0000-0002-0057-3357;
Gagarina T.Yu., https://orcid.org/0000-0003-3071-4146;
Malygina O.G., https://orcid.org/0000-0002-3822-796X;
Leikhter S.N., https://orcid.org/0000-0002-0538-6753;
Bashilova E.N., https://orcid.org/0000-0002-9247-6633;
Bazhukova T.A., https://orcid.org/0000-0002-7890-2341.

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

Acknowledgment. *This work was financially supported by the «Internal competition of grants for young scientists in priority areas of development of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, NSMU, Arkhangelsk» № 162 dated 02/05/2021, the project «Monitoring the formation of antibiotic resistance of microbial biotopes of the oral cavity and optimization of pathogenetic approaches in the treatment of inflammatory periodontal diseases».*

Received 11.03.2022

Accepted 25.04.2022

Published 15.08.2022

Введение. Микробиота ротовой полости обладает высоким потенциалом к саморегуляции и поддержанию эндозеологического гомеостаза, обеспечивая колонизационную резистентность и формирование многих неспецифических и иммунных защитных реакций [1]. Основные показатели резистентности организма, включая специфические и неспецифические компоненты, клеточные и гуморальные механизмы, функционируя в тесной взаимосвязи, обеспечивают устойчивость тканей полости рта, в том числе, и пародонта, к агрессивному воздействию продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Дисбаланс микробиоты биотопов полости рта, сдвиги в процессах иммунного реагирования, лежат в основе патологических процессов, ведущих к развитию и прогрессированию воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) [2, 3].

Проблемными бактериями, отвечающими за возникновение и прогрессирование ВЗП является грамотрицательная анаэробная микрофлора: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, отличающиеся высокими адгезивными, инвазивными, токсическими свойствами [4]. Нарушению эндозеологического равновесия полости рта способствует эндотоксемия: выработка бактериальных токсинов, например, лейкоцидина, глотоксина, продуктов метаболизма бактерий, что способствует повреждению клеток. Вирулентность пародонтопатогенных бактерий может способствовать прямому токсическому воздействию, приводящему к воспалению и деструкции тканей пародонта, и опосредованному, путём стимуляции иммунопатологических реакций [5].

Липополисахарид (ЛПС) – основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, является высокоактивным биологическим веществом: при

его взаимодействии с TLR-4 миелоидных клеток происходит активация каскада воспалительных реакций, сопровождающаяся выбросом в кровь растворимого рецептора CD₁₄ (sCD₁₄), который является не только маркером активации клеток эндотоксином, но и маркером микробной транслокации. Воздействуя на антиген дифференцировки моноцитов CD₁₄, являющийся первым сигнальным маркером детекции патоген-ассоциированных молекулярных паттернов бактериальной природы, sCD₁₄ может оказывать влияние на действие ЛПС различными путями: являться промежуточным звеном в переносе ЛПС на липопротеины, в результате чего происходит нейтрализация ЛПС [6]. sCD₁₄ облегчает активацию ЛПС CD₁₄-негативных клеток, например, эпителиальных клеток. Высокая концентрация sCD₁₄ блокирует ЛПС-индуцированную активацию моноцитов [7]. sCD₁₄ играет ключевую роль в регуляции клеточного ответа на ЛПС: может его как активировать, так и ингибировать [8]. Определение концентрации sCD₁₄ при ВЗП может отражать состояние резистомы полости рта и быть прогностическим критерием перехода гингивита в пародонтит, тяжести течения ВЗП. Цель исследования – оценка уровня секреции растворимого рецептора CD₁₄ в образцах отделяемого зубодесневового кармана при воспалительных заболеваниях пародонта и его взаимосвязи с маркерами пародонтопатогенами.

Материал и методы. Проведено комплексное стоматологическое клинко-лабораторное обследование 88 человек, постоянно проживающих в Архангельской области (г. Северодвинск), по дизайну исследование поперечное. Методики включали анкетирование и стоматологический осмотр, иммунологический и молекулярно-генетический анализ. Сбор данных выполнен в соответствии с международным стандартом GCP и по методике, рекомендованной ВОЗ. Протокол прово-

димого исследования одобрен локальным этическим комитетом СГМУ (протокол № 08/11 от 28.11.2018 г.). Обследованы 56 больных в возрасте от 18 до 45 лет с воспалительными заболеваниями пародонта, находящихся на амбулаторном лечении у врача-стоматолога, и 32 человека группы контроля (практически здоровые лица такого же возраста). Критериями включения являлись: письменное информированное согласие на участие в исследовании; возраст от 18 до 45 лет; хронический пародонтит лёгкой и средней степени; удовлетворительный уровень гигиены полости рта. Критерии исключения: отсутствие информированного согласия пациента; возраст до 18 лет и старше 45 лет. Обследованные разделены на группы: 1-я группа – пациенты с диагнозом «хронический пародонтит» лёгкой и средней степени в соответствии с МКБ 10: K05.31 – хронический (генерализованный) пародонтит (лёгкая, средняя степень) ($n=56$); 2-я группа – контрольная (пациенты с интактным пародонтом) ($n=32$).

Для оценки распространённости и интенсивности болезни пародонта использованы индексы: CPI (Community Periodontal Index), папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА), в качестве индекса гигиены полости рта – упрощённый индекс Грина-Вермиллиона (ОHI-S), проводилась регистрация кариозного процесса (КПУ).

В карте обследования для оценки стоматологического статуса взрослых (ВОЗ, 2013 г.) каждому зубу присвоен код. Для определения индекса CPI в десневую бороздку погружали градуированный металлический пуговчатый зонд с шариком на конце, диаметром 0,5 мм в области всех зубов. Впоследствии полость рта условно разделена на 6 секстантов, если в секстанте остался один зуб, он добавлялся в соседний секстант, а данный исключался из исследования. Протокол проведения исследования десневой жидкости: маргинальная десна исследуемых зубов изолировалась от слюны и ротовой жидкости с помощью ватных валиков. Зубы и окружающая их десна высушивались струей воздуха.

Клиническим материалом являлось отделяемое зубодесневого кармана (ЗДК), полученное в ходе амбулаторного приёма путём аспирации с помощью стерильного шприц-тюбика. Полученную пробу центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут. Аликвоты образцов замораживали и хранили при $t = -80^{\circ}\text{C}$ до проведения молекулярно-генетических и иммунологических исследований.

Содержание растворимой формы CD_{14} (sCD_{14}) в отделяемом ЗДК определяли с помощью иммуноферментного анализа в одномоментно размороженных пробах согласно инструкциям к наборам производителя («Nucult Biotech», Нидерланды). Оптическую плотность содержимого ячеек планшета измеряли и регистрировали на фотометре «Multiscan EX» («Thermo Fisher Scientific», США). Результаты рассчитывали в соответствии с прилагаемыми к наборам инструкциями по калибровочным кривым, построенным на основании измерения стандартов.

Маркёрные пародонтопатогены *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (пародонтопатогенные бактерии I порядка), *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* (пародонтопатогенные бактерии II порядка), грибы *Candida albicans* выявлялись с помощью метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) в соответствии с инструкциями к наборам производителя («ПародонтоСкрин», ООО «ДНК-Технология», Россия).

Статистическая обработка полученных результатов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведён с помощью пакета программ для статистической обработки данных STATA v.12 (Stata Corp, TX, USA). Категориальные переменные представлены в виде абсолютных чисел (n) и долей (в %), количественные – с помощью средней и стандартного отклонения для данных с нормальным распределением. Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали с помощью двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Применялся корреляционный анализ Пирсона. Критический уровень статистической значимости составил $p < 0,05$.

Результаты. Средние концентрации sCD_{14} в отделяемом зубодесневого кармана составили $2,03 \pm 0,6$ нг/мл в группе контроля и $17,2 \pm 4,06$ нг/мл в группе пациентов с хроническим пародонтитом ($p = 0,006$). Состояние полости рта у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта с учётом индекса CPI, включающего в себя оценку кровоточивости дёсен, наличие минерализованных зубных отложений (зубной камень), наличие и глубину пародонтального кармана, представляло собой следующее: распространённость признака «кровоточивость» составила – 51,8% ($n=29$), зубной камень зарегистрирован у 66,1% ($n=37$), пародонтальный карман глубиной 4-5 мм у 39,3% ($n=22$), глубиной 6 мм и более у 16,1% ($n=9$).

При изучении структуры пародонтального индекса, признак кровоточивости в группе лиц с воспалительными заболеваниями пародонта отмечен в 51,8% случаев (интенсивность $0,2 \pm 0,69$ секстанта). Наличие зубного камня зарегистрировано в 66,1% случаев (интенсивность $1,56 \pm 0,16$ секстанта). Пародонтальный карман глубиной 4-5 мм выявлен у 39,3% обследованных (интенсивность $0,84 \pm 0,19$ секстанта). Карман глубиной 6 мм и более при измерении обнаружен у 16,1% лиц (интенсивность $0,31 \pm 0,14$ секстанта). При анализе распределения признаков заболевания пародонта по секстантам установлено, что наилучшие показатели выявлены во втором секстанте, что объясняется эстетической важностью зубов фронтального отдела верхней челюсти. В данном секстанте кровоточивости нет, здоровый пародонт у 96,43%. Пародонтальный карман 4-5 мм у 3,6%, 6 мм и больше у 1,8%. 5 секстант заметно отличается большим количеством над- и поддесневых минерализованных зубных отложений (82,4%), пародонтальные карманы глубиной 4-5 мм выявлены у 14,3%.

При изучении зависимости концентрации sCD_{14} от индексов гигиены полости рта и состояния пародонта, установлены корреляции средней и высокой степени между концентрациями sCD_{14} и изучаемыми индексами в группе лиц с хроническим пародонтитом, в группе контроля соответствующих корреляций не выявлено. Папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс, степень активности кариозного процесса, активность и выраженность пародонтальных изменений положительно коррелировали с повышенным содержанием растворимого корцептора (см. таблицу).

Для установления точек приложения растворимого sCD_{14} определены маркёры пародонтопатогенных микроорганизмов зубодесневого кармана. В группе пациентов с диагнозом хронический пародонтит частота выявления пародонтопатогенных бактерий составила 89,3%. Наиболее часто (80,35%) выявлялись маркёры *P. gingivalis*, в 57,1% случаев – *T. forsythia*, в 50% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 42,9% случаев – *P. intermedia*,

в 28,6% случаев – *T. denticola*, в 10,7% случаев – *C. albicans*. Ассоциации пародонтопатогенов выявлены у 26 пациентов (46,4%), наиболее часто встречались комбинации *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* – у 39,3%, *P. gingivalis* и *T. forsythia* – у 33,9%, *P. intermedia* и *T. denticola* – у 16%.

В контрольной группе (с интактным пародонтом) пародонтопатогенная микрофлора выявлена у 10 обследованных (31,25%). На первом месте по встречаемости – *P. intermedia* (в 15,6%), *T. denticola* – в 9,4%, *A. actinomycetemcomitans* и *T. forsythia* в 3,1%, соответственно. В целом низкое содержание sCD₁₄ десневой жидкости у лиц контрольной группы имело интересную особенность: внутри подгруппы с выделенными пародонтопатогенами содержание sCD₁₄ почти в 1,5 раза выше по сравнению с обследованными контрольной группы с отрицательным результатом ПЦР-диагностики пародонтопатогенов.

Интересная зависимость в содержании sCD₁₄ (более или менее 15 нг/мл) наблюдалась при различной встречаемости пародонтопатогенных бактерий в группе пациентов с хроническим пародонтитом. При высоких концентрациях растворимого корецептора выделялось большее количество пародонтопатогенных бактерий I и II порядка (см. рисунок).

При установлении структуры пародонтального индекса в зависимости от выделяемых в зубодесневом кармане микроорганизмов, обнаружено, что в группе пациентов с хроническим пародонтитом при признаке «кровоточивость дёсен» выделялись пародонтопатогенные бактерии: *A. actinomycetemcomitans* в 53,57% случаев, *P. gingivalis* в 44,6%, *T. forsythia* в 37,5%. В меньшей степени за кровоточивость отвечали *P. intermedia* и *T. denticola* – по 21,4%, соответственно. Признак «зубной камень» в 85,7% случаев ассоциировался с выделением *P. gingivalis*. При глубине пародонтального кармана 4-5 мм выделены *P. gingivalis* – в 35,7%, *T. forsythia* – в 32,14%, *A. actinomycetemcomitans* – в 21,4% случаев. При наличии глубоких пародонтальных карманов (6 мм и более) выделены ассоциации пародонтопатогенов: *P. gingivalis* с *T. forsythia* в 10,7%, *P. gingivalis* с *T. forsythia* и *A. actinomycetemcomitans* в 5,3% случаев.

Обсуждение. Теории развития и прогрессирования ВЗП включают воспалительно-дистрофическую и иммунную. Микроорганизмы полости рта оказывают мощное позитивное модулирующее действие на иммунную систему организма, обеспечивая колонизационную резистентность, но с другой стороны обеспечивают накопление в зубной бляшке адьювантов и иммуносупрессивных агентов, воздействующих токсически на ткани десны и пародонт [9 – 11].

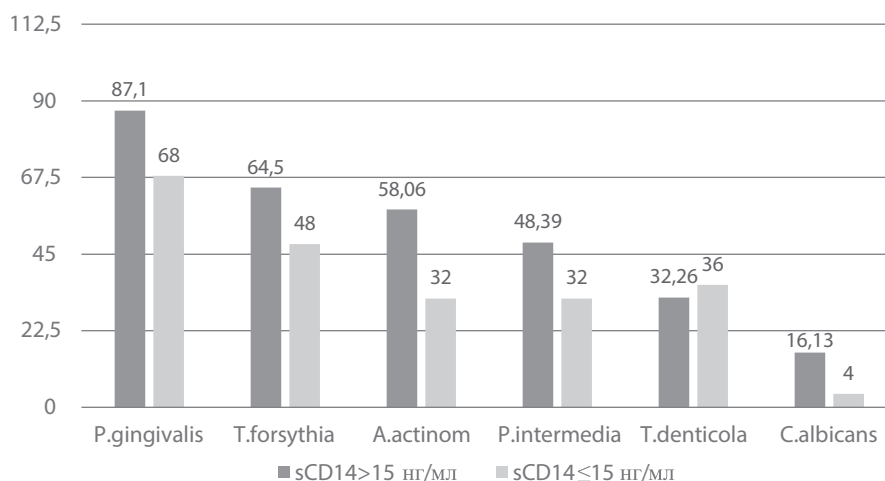
Деструктивные изменения пародонта в большей степени определяются высокими инвазивными, адгезивными и токсическими свойствами пародонтопатогенных бактерий *P. gingivalis* и *T. forsythia* [12,13]. В нашем исследовании среди пациентов с диагнозом хронический пародонтит частота выявления пародонтопатогенных бактерий составила 89,3%. Приоритетными пародонтопатогенными

бактериями I порядка, способствующими развитию воспалительной реакции, приводящей к нарушению целостности зубодесневого эпителия и образованию глубоких пародонтальных карманов, стали *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*. Выделение данных пародонтопатогенов и наличие факторов агрессии и эндотоксинов ведёт к угнетению местного иммунитета полости рта и снижению общей резистентности организма.

Нарушение барьерной функции слизистой оболочки и связанное с этим всасывание ЛПС и других микробных антигенов в системный компартмент ведёт к массивной воспалительной реакции в тканях пародонта и эндотоксемии. Высвобождающийся при инвазии клеток ЛПС грамотрицательных бактерий связывается с ЛПС-связывающим белком, который усиливает связь со специфическим гликопротеином CD₁₄, экспрессированным на мембранах мононуклеарных клеток. Образование комплекса ЛПС-ЛПС-связывающий белок-CD₁₄ ведёт к активации TLR₄-зависимого механизма передачи сигнала, запуская воспалительную реакцию организма в виде активации макрофагов и выброса провоспалительных цитокинов, после чего CD₁₄ сливается и переходит в растворимую форму sCD₁₄ [14]. Выявлено достоверное превышение средних значений концентрации растворимого sCD₁₄ у пациентов с хроническим пародонтитом (17,2±4,06 нг/мл) по сравнению с группой контроля (2,03±0,6 нг/мл, $p=0,006$). Наши результаты подтверждают данные предыдущих исследований [15] о роли sCD₁₄ как маркера острой фазы при пародонтите, уровень которого возрастает по мере тяжести течения заболевания. Основными функциями белков острой фазы являются тканевое восстановление, модуляция коагуляции, нейроэндокринная секреция, опсонизация бактерий и участие в фагоцитозе. Активация фагоцитоза при этом сопровождается расщеплением sCD₁₄ [16].

Корреляция уровня sCD₁₄ отделяемого зубодесневого кармана с индексами гигиены полости рта у лиц с хроническим пародонтитом ($n=56$)

Признак	ОHI-S	PMA	CPI	КПУ
sCD14, нг/мл	$r=0,41$ $p=0,006$	$r=0,72$ $p=0,008$	$r=0,78$ $p<0,001$	$r=0,86$ $p=0,003$



Частота встречаемости пародонтопатогенных бактерий при уровнях секреции sCD₁₄ более или менее 15 нг/мл в группе пациентов с хроническим пародонтитом (в %).

У пациентов с хроническим пародонтитом, обследованных нами, высокие концентрации растворимого sCD₁₄ (более 15 нг/мл) положительно коррелировали с выделением пародонтопатогенных бактерий I и II порядка и их ассоциаций. На 19,1% чаще выявлялась *P. gingivalis*, на 16,5% – *T. forsythia*, на 26,06% – *A. actinomycetemcomitans*, чем в подгруппе пациентов, имеющих более низкие концентрации sCD₁₄. При этом у обследованных в группе контроля внутри подгруппы с выделенными пародонтопатогенами I порядка в исследуемых участках зубодесневой борозды содержание sCD₁₄ почти в 1,5 раза выше по сравнению с представителями контрольной группы с отсутствием выявления нуклеиновой кислоты пародонтопатогенов. Возможно, именно sCD₁₄ играет роль первоочередного сдерживающего фактора прогрессирования воспалительной и деструктивной реакции, являясь маркером микробной транслокации, промежуточным звеном в переносе ЛПС на липопроотеины, в результате чего происходит нейтрализация ЛПС. Высокие концентрации sCD₁₄, выявленные в нашем исследовании, могут блокировать ЛПС-индуцированную активацию моноцитов, при этом sCD₁₄ может, как повышать, так и снижать клеточный ответ на ЛПС.

При воспалительных заболеваниях пародонта изменяются процессы образования sCD₁₄, что, вероятно, обусловлено колонизацией пародонтопатогенных бактерий и действием их токсинов и факторов агрессии. Взаимосвязи маркерных пародонтопатогенов с уровнем секреции иммунного компонента sCD₁₄ и его влияние на структуру пародонтального индекса отражают сдвиги в процессах репаративной регенерации слизистой оболочки полости рта и регуляции местного иммунитета в ответ на микробную инвазию. Определение концентрации sCD₁₄ при ВЗП может отражать состояние резистама полости рта и быть прогностическим критерием перехода гингивита в пародонтит, тяжести течения заболевания. Принимая во внимание вариабельные концентрации и индивидуальные особенности секреции sCD₁₄ целесообразно применять многокомпонентные диагностические панели, учитывающие больший спектр факторов, включая систему антимикробных пептидов, комплемента, цитокинов и других компонентов для получения точных прогностических критериев.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 5-9, 12, 14-16 см. REFERENCES)

- Локтионов А. Л., Конопля А. И., Лунёв М. А., Караулов А. В. Иммунные и окислительные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Иммунология*. 2015; 36(5): 319-28.
- Дзюба Е. В., Нагаева М. О., Жданова Е. В. Роль иммунологических процессов в развитии воспалительных заболеваний пародонта и возможности их коррекции. *Проблемы стоматологии*. 2019; 2(15): 25-31.
- Царёв В. Н., Николаева Е. Н., Ипполитов Е. В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 5: 101-12.
- Ганковская Л. В., Хелминская Н. М., Молчанова Е. А., Свитич О. А. Роль факторов врождённого иммунитета в патогенезе пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 2: 100-7.
- Давидович Н. В., Соловьёва Н. В., Галиева А. С., Лепёшкин С. Ю., Башилова Е. Н., Писарева С. Н. и др. Роль системы антимикробных пептидов в неспецифической защите полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (7): 422-7. DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-7-422-427.

- Ипполитов Е. В. Мониторинг формирования микробной биоплёнки и оптимизация диагностики воспалительных заболеваний пародонта. Дис. д-ра мед. наук. М.; 2016.

REFERENCES

- Patini R., Staderini E., Lajolo C., Lopetuso L., Mohammed H., Rimondini L. et al. Relationship between oral microbiota and periodontal disease: a systematic review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018; Sep; 22(18): 5775-88. DOI: 10.26355/eurrev_201809_15903. PMID: 30280756.
- Loktionov A. L., Konoplya A. I., Lunev M. A., Karaulov A. V. Immune and oxidative disorders in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Immunologiya*. 2015; 36(5): 319-28. (in Russian)
- Dzyuba E. V., Nagaeva M. O., Zhdanova E. V. The role of immunological processes in the development of inflammatory periodontal diseases and the possibility of their correction. *Problemy stomatologii*. 2019; 2 (15): 25-31. (in Russian)
- Tsarev V. N., Nikolaeva E. N., Ippolitov E. V. Periodontal pathogenic bacteria are the main factor in the onset and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 5: 101-12. (in Russian)
- Costalonga M., Herzberg M. C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol. Lett.* 2014; Dec; 162(2 Pt A): 22-38. DOI: 10.1016/j.imlet.2014.08.017. Epub. 2014 Nov.8. PMID: 25447398; PMCID: PMC4346134.
- Torrunguang K., Jitpakdeebordin S., Charatkulangkun O., Gleebeua Y. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0136646.
- Kitchens R.L., Thompson P.A. Modulatory effects of sCD₁₄ and LBP on LPS-host cell interactions. *J. Endotoxin. Res.* 2005; 11(4):225-9. DOI: 10.1179/096805105X46565. PMID: 16176659.
- Yaegashi Y., Shirakawa K., Sato N., Suzuki Y., Kojika M., Imai S. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD₁₄ subtype as a marker for sepsis. *J. Infect. Chemother.* 2005 Oct; 11(5):234-8. DOI: 10.1007/s10156-005-0400-4. PMID: 16258819.
- Lau M.Y., Dharmage S.C., Burgess J.A., Lowe A.J., Lodge C.J., Campbell B. et al. CD₁₄ polymorphisms, microbial exposure and allergic diseases: a systematic review of gene-environment interactions. *Allergy*. 2014; 69(11):1440-53. DOI: 10.1111/all.12454.
- Gankovskaya L.V., Khelminskaya N.M., Molchanova E.A., Svitich O.A. The role of innate immunity factors in the pathogenesis of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 2: 100-7. (in Russian)
- Davidovich N.V., Solov'yeva N.V., Galieva A.S., Lepeshkin S.Yu., Bashilova E.N., Pisareva S.N. et al. Role of antimicrobial peptides system in inflammatory periodontal diseases non-specific oral cavity protection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66 (7): 422-7. (in Russian) DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-7-422-427.
- Nibali L., Di Iorio A., Onabolu O., Lin G.H. Periodontal infectogenomics: systematic review of associations between host genetic variants and subgingival microbial detection. *J. Clin. Periodontol.* 2016; 43(11):889-900. DOI: 10.1111/jcpe.12600. Epub 2016 Sep 26. PMID: 27440507.
- Ippolitov E.V. Monitoring the formation of microbial biofilm and optimization of the diagnosis of inflammatory periodontal diseases. Diss.... Moscow; 2016. (in Russian)
- Vitkov L., Munoz L.E., Knopf J., Schauer C., Oberthaler H., Minnich B. et al. Connection between periodontitis-induced low-grade endotoxemia and systemic diseases: neutrophils as protagonists and targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(9):4647. DOI: 10.3390/ijms22094647. PMID: 33925019; PMCID: PMC8125370.
- Behm C., Blufstein A., Gahn J., Noroozkhani N., Moritz A., Rausch-Fan X. et al. Soluble CD₁₄ enhances the response of periodontal ligament stem cells to Toll-Like receptor 2 agonists. *Mediators Inflamm.* 2019; 2019:8127301. DOI: 10.1155/2019/8127301. PMID: 31178663; PMCID: PMC6507176.
- Zanoni I., Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013; 24; 3:32. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00032. PMID: 23898465; PMCID: PMC3721004.

Симонов О.А., Симонова Е.О., Мальчевский В.А.

ПУТИ СНИЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ТРУДОЁМКОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА ОПТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИИ

ФГБУ Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения РАН, 625026, Тюмень, Россия

Оценена трудоёмкость (в часах) оптического способа подсчёта микробных клеток в суспензии по сравнению с методом подсчёта микробных клеток с использованием камеры Горяева. Актуальность оценки производственной трудоёмкости способов подсчёта микробных клеток в суспензии связана с необходимостью использовать их во многих исследованиях. Зачастую широко применяемые методы слишком трудозатратны, длительны или требуют применения дорогостоящего оборудования. Проведён сравнительный эксперимент ранее разработанного нами «Способ оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии» (приоритетная справка № 2016141859 от 25.10.2016 г) и способа подсчёта микробных клеток с использованием камеры Горяева. Производственная трудоёмкость выполняемых измерений рассчитывалась в часах по формуле: $T_{пр} = T_m + T_{об}$, где $T_{пр}$ – трудоёмкость производственная, T_m – трудоёмкость технологическая, $T_{об}$ – трудоёмкость обслуживания. Технологическая трудоёмкость измерений с использованием камеры Горяева составляла $32,18 \pm 0,95$, тогда как оптическим способом $1,03 \pm 0,06$ (достоверность различий при $p < 0,01$) при количестве измерений $n = 100$. Трудоёмкость обслуживания при оптическом способе $0,24 \pm 0,03$, при применении метода с использованием камеры Горяева $0,15 \pm 0,01$ часов. Производственная трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева остаётся ($p < 0,01$) выше, чем при оптическом способе оценки, $32,33 \pm 0,96$ и $1,27 \pm 0,05$ часов соответственно. При применении оптического способа оценки концентрации в суспензии необходимо проводить не малый объём необходимых математических вычислений, что в будущем, возможно, скорректировать путём создания специальной программы для персональных ЭВМ. Производственная трудоёмкость результатов получаемых при выполнении измерений способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии ниже, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. Принимая во внимание, что его осуществление не требует, как при турбидиметрии, закупки специального оборудования, то его экономическая эффективность перед существующими очевидна.

Ключевые слова: микроорганизм; штамм; измерения; концентрация; КОЕ; камера Горяева; турбидиметрия; трудоёмкость.

Для цитирования: Симонов О.А., Симонова Е.О., Мальчевский В.А. Пути снижения производственной трудоёмкости применения способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (8): 476–479. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-476-479>

Для корреспонденции: Симонова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотр. отдела биоресурсов криосферы; e-mail: mailsimonova@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 04.03.2022

Принята к печати 24.06.2022

Опубликовано 15.08.2022

Simonov O.A., Simonova E.O., Malchevskiy V.A.

WAYS TO REDUCE THE LABOR INTENSIVENESS OF APPLYING THE METHOD OF OPTICAL ESTIMATION OF MICROBIAL CELL CONCENTRATION IN SUSPENSION

Tyumen Scientific Centre SB RAS, 625026, Tyumen, Russia

The labor intensity (in hours) of the optical method of microbial cell counting in suspension compared to the method of microbial cell counting using a Goryaev chamber is evaluated. The relevance of assessing the production labor intensity of microbial cell counting methods in suspension is related to the need to use them in many studies. Often the commonly used methods are too labour-intensive, time-consuming, or require expensive equipment. A comparative experiment was carried out with our previously developed “Method for optical estimation of microbial cell concentration in suspension” (Priority certificate No. 2016141859 dated 25.10.2016) and the method of microbial cell counting using a Goryaev chamber. Production labor intensity of the measurements performed was calculated in hours according to the formula: $T_p = T_t + T_{ob}$, where T_p is production labour input, T_t is technological labour input, T_{ob} is maintenance labour input. Technological labour input of measurements with use of Goryaev's chamber made up $32,18 \pm 0,95$, whereas with optical method – $1,03 \pm 0,06$ (reliability of differences at $p < 0,01$) at amount of measurements $n = 100$. Labour input of service at optical method $0,24 \pm 0,03$, at application of method with use of Goryaev chamber $0,15 \pm 0,01$ hours. Labour input of measurements of concentration of microbial cells in suspension at application of method of measurement with Goryaev chamber remains ($p < 0,01$) higher than at an optical method of estimation, $32,33 \pm 0,96$ and $1,27 \pm 0,05$ hours accordingly. When using the optical method of concentration estimation in the suspension it is necessary to carry out not a small amount of necessary mathematical calculations, which in the future, probably, corrected by creating a special program for a personal computer. The labour input of results obtained by measuring by optical evaluation of the concentration of microbial cells in suspension is lower than that obtained by using a measurement method using a Goryaev chamber. Taking into consideration that its implementation does not require purchase of special equipment as in turbidimetry, its cost-effectiveness compared to existing ones is obvious.

Key words: microorganism; strain; measurements; concentration; CFU; Goryaev chamber; turbidimetry; labour intensity.

For citation: Simonov O.A., Simonova E.O., Malchevskiy V.A. Ways to reduce the labor intensiveness of applying the method of optical estimation of microbial cell concentration in suspension. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 476-479 (in Russ.). DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-476-479

For correspondence: Simonova Ekaterina Olegovna, Junior Researcher, Department of Cryosphere Bioresources; e-mail: mail-simonova@gmail.com

Information about authors:

Simonov O.A., <https://orcid.org/0000-0003-2362-3588>;

Simonova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-0238-6993>;

Malchevskiy V.A., <https://orcid.org/0000-0002-1308-2899>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 04.03.2022

Accepted 24.06.2022

Published 15.08.2022

Введение. В процессе выполнения медицинских [1], микробиологических и биотехнологических исследований возникает необходимость определения количества микробных клеток в различных средах [2,3]. Широко применяемые на сегодняшний день методики определения количества микробных клеток в суспензиях не требующие специального дорогостоящего оборудования, например с использованием счётной камеры Горяева¹ весьма трудозатратны. Для определения количества микробных клеток в суспензиях при помощи специального оборудования используется метод турбидиметрии. Перед его выполнением необходимо составить калибровочные графики индивидуальные для каждого исследуемого микроорганизма, что достаточно трудоёмко, длительно, требует привлечения других методов для получения образцов с известным количеством микробных клеток в единице объёма. Требуется закупка и техническое обслуживание дорогих, узкоспециализированных приборов, что ведёт к повышению себестоимости проводимых работ. Для решения сложившейся проблемы нами разработан «Способ оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии» приоритетная справка № 2016141859 от 25.10.2016 г., не требующий наличия дорого узкоспециализированного оборудования основанный на использовании асимптотического приближения теории светорассеяния.

В связи с вышеизложенным, оценка производственной трудоёмкости результатов получаемых при применении способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии актуальна.

Цель исследования: оценить производственную трудоёмкость результатов получаемых при применении способа оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии.

Материал и методы. Для достижения поставленной цели проведён сравнительный эксперимент по определению концентрации микроорганизмов в суспензии способом с использованием камеры Горяева и предложенным способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии.

В качестве материала для исследования выбран, идентифицированный методом сиквенса по 16S RNA, штамм MG8 – *Bacillus sp. (cereus)*. Бактерии высевали

в пробирки на скошенный агар и культивировали 24 ч в термостате при температуре +26°C, после чего микроорганизмы смывали с поверхности питательной среды дистиллированной водой в объёме 5 мл. Каждым из сравниваемых способов определены концентрации микроорганизмов в 100 различных суспензиях.

Определение концентрации микроорганизмов с использованием камеры Горяева осуществляли следующим образом: в камеру Горяева помещали суспензию, полученную методом серийных разведений, концентрацией 1/10000 от концентрации смыва. Далее проводили фотофиксацию сеток камеры, подсчёт количества микроорганизмов на полученных снимках и обработка данных по методике ОФС¹.

Определение концентрации микроорганизмов в суспензии предложенным способом выполняли по следующему алгоритму: подготавливали две дисперсионные среды с различными показателями преломления, а именно 10% и 40% растворы глюкозы и исследуемые суспензии микроорганизмов. Для этого в девять частей дисперсионной среды помещали одну часть микробной суспензии. Суспензии хорошо перемешивали. Далее, измеряли показатели преломления полученных суспензий с использованием рефрактометра RL3 производства фирмы Polskie Zaklady Optyczne по методике, изложенной в инструкции производителя. Получали значения показателя преломления первой (μ_{s1}) и второй (μ_{s2}) дисперсионной среды.

Полученные суспензии помещали в кюветы спектрофотометра ПЭ-5400УФ производства ООО «Экохим» (Россия), которые устанавливали в измерительную камеру спектрофотометра. Третья кювета являлась контрольной, в неё помещали дистиллированную воду.

Проводили измерения оптической плотности суспензий (относительно контрольной кюветы) на двух длинах волн $\lambda_1=450$ нм и $\lambda_2=600$ нм, получали значения D_{λ_1} и D_{λ_2} . Используя определение волнового экспонента по формуле:

$$n = \frac{-\lg D_{\lambda_1} - \lg D_{\lambda_2}}{\lg \lambda_1 - \lg \lambda_2},$$

рассчитывали волновые экспоненты для исследуемых суспензий n_1 и n_2 .

Применяя асимптотическое приближение определяли безразмерный параметр p [4] для каждой из двух дисперсионных сред используя формулы [5]:

$$p(n) = a/(b+n-2) + c, \text{ для } 2 \leq n \leq 3,5;$$

¹Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание 2015; 2: 624-627. Определение концентрации микробных клеток ОФС.1.7.2.0008.15.

$$p(n) = 3(y + n \cdot q) / (h + y)^{1/2}, \text{ для } 1 \leq n \leq 2.$$

Где y, a, b, c, d, e, q, h определяли следующим образом ($m_1 = m - 1$; $m = \mu_b / \mu_s$) [6]:

$$y = 2 - n - (2 - n)^2 / 20;$$

$$a = b \cdot d;$$

$$b = 1,5 \cdot (d/e - 1);$$

$$q = m_1 \cdot (1 - 0,8 \cdot \exp(-11 \cdot m_1)) / 3;$$

$$h = (2 \cdot q)^{1/3};$$

$$c = 3 \cdot h - d;$$

$$d = e \cdot (3 \cdot h - \rho_1) \cdot (1,5 - \rho_1) / (1,5 \cdot (3 \cdot h - \rho_1) - e \cdot \rho_1);$$

$$e = 3 \cdot h - 2 \cdot m_1 \cdot (0,22 + 0,58 \cdot m);$$

$$\rho_1 = 0,1 + m_1 \cdot (3,9 - 5 \cdot m_1 + 0,5 / (1 + 1000 \cdot (m_1 - 0,05)^2)).$$

По известным n_1 и n_2 рассчитывали значения $\rho(n_1)$ и $\rho(n_2)$.

Так как, по определению $\rho = 4 \cdot \pi \cdot R_{cp} \cdot \mu_s \cdot (\mu_b / \mu_s - 1) / \lambda$ [5], при одинаковой длине волны этот параметр зависит только от соотношений показателей преломлений бактерий и среды, то, по известным значениям $\rho(n_1)$ и $\rho(n_2)$ мы определяли значение показателя преломления бактерий:

$$\rho(n_1) / \rho(n_2) = (\mu_b - \mu_{s1}) / (\mu_b - \mu_{s2});$$

откуда:

$$\mu_b = \mu_{s2} \cdot \rho(n_1) / \rho(n_2) - \mu_{s1} / \mu_{s2} \cdot \rho(n_1) / \rho(n_2) - 1,$$

где:

μ_{s1} – показатель преломления 1-й дисперсионной среды;

μ_{s2} – показатель преломления 2-й дисперсионной среды;

$\rho(n_1)$ – безразмерный параметр ρ для 1-й дисперсионной среды, определённый по волновому экспоненту n_1 ;

$\rho(n_2)$ – безразмерный параметр ρ для 2-й дисперсионной среды, определённый по волновому экспоненту n_2 ;

μ_b – показатель преломления бактерий.

Используя значение параметра ρ и найденный показатель преломления бактерий, для любой из дисперсионных сред оценивался средний размер бактерий исходя из определения ρ [4]:

$$R_{cp} = \rho \cdot \lambda / (4 \cdot \pi \cdot (\mu_b - \mu_s)),$$

С помощью асимптотического приближения [5] находили коэффициент светорассеяния;

$$K_s = K_2 \cdot \left\{ 1 + \frac{0,3724 - 0,2974 \cdot m}{[\alpha + 4 \cdot (\alpha - 0,8)^3 - 0,744]} \right\}; \text{ для } 2 \leq n \leq 3,3;$$

$$K_s = Q(\rho) \cdot \frac{m - m_1^2}{\left[1 + (0,3 \cdot m - 0,28) \cdot \left(\frac{3h}{\rho} \right)^3 \right]}; \text{ для } -1 \leq n \leq 2;$$

где:

$$K_2 = A \cdot \alpha \cdot [3,25m + 1,55] \cdot \alpha - 3,4;$$

$$A = \left[\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2^2} \right];$$

$$\alpha = 2 \cdot \pi \cdot R_{cp} \cdot \mu_s / \lambda.$$

Определяли концентрацию микроорганизмов (N) в исследуемой суспензии по формуле:

$$N = \pi \cdot R_{cp} \cdot 2 \cdot K_s,$$

которая выведена нами из формулы [6]:

$$\tau = \pi \cdot r \cdot 2 \cdot K_s(r, \lambda, m) \cdot N,$$

где мутность суспензии (τ) вычисляли по ранее измеренной оптической плотности среды:

$$\tau = 2,3 \cdot D \left(\frac{1}{cm} \right).$$

Концентрацию микроорганизмов в неразведённой суспензии рассчитывали по формуле:

$$x = 10 \cdot N.$$

Производственная трудоёмкость выполняемых измерений вычисляли в часах:

$$T_{пр} = T_{т} + T_{об},$$

где:

$T_{пр}$ – трудоёмкость производственная;

$T_{т}$ – трудоёмкость технологическая;

$T_{об}$ – трудоёмкость обслуживания.

Статистический обшёт материала проводил согласно международным требованиям, предъявляемым к обработке результатов данных научных исследований, при помощи программы для персональных компьютеров «SPSS 11,5 for Windows» (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по критерию Стьюдента, частотный анализ).

Результаты и обсуждение. Трудоёмкость (в часах) измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии представлена в таблице.

Технологическая трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева статистически достоверно ($p < 0,01$) выше чем при оптическом способе оценки. В то же время, трудоёмкость обслуживания при оптическом способе оценки достоверно ($p < 0,01$) выше, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. В общем, несмотря на более низкую трудоёмкость обслуживания, производственная трудоёмкость измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии при применении метода измерения с использованием камеры Горяева остаётся ($p < 0,01$) выше, чем при оптическом способе оценки.

Необходимо учитывать, что при применении оптического способа оценки концентрации микробных клеток в суспензии, можно получить без отдельных трудозатрат дополнительные важные для исследователей данные о бактериях данного штамма, такие как показатель преломления и их средний радиус.

При применении оптического способа оценки концентрации микробных клеток в суспензии выявлен его недо-

Трудоёмкость (в часах) измерений концентрации микробных клеток штамма MG8 в суспензии ($M \pm m$)

Виды трудоёмкости (в часах)	Методы измерения концентрации микробных клеток в суспензии	
	с использованием камеры Горяева ($n=100$)	оптическим способом оценки ($n=100$)
Технологическая	32,18±0,95 ¹	1,03±0,06
Обслуживания	0,15±0,01	0,24±0,03 ¹
Производственная	32,33±0,96 ¹	1,27±0,05

Примечание. n – число измерений; ¹ – достоверность различий при $p < 0,01$.

статок, повышающий технологическую трудоёмкость измерений – не малый объём необходимых математических вычислений. Можно, в будущем, успешно реализовать данный резерв для дальнейшего повышения технологической трудоёмкости измерений путём создания специальной программы для персональных ЭВМ.

Заключение. Производственная трудоёмкость результатов, получаемых при выполнении измерений способом оптической оценки концентрации микробных клеток в суспензии ниже, чем при применении метода измерения с использованием камеры Горяева. Принимая во внимание, что его осуществление не требует, как при турбидиметрии, закупки специального оборудования, то его экономическая эффективность очевидна.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3 см. REFERENCES)

1. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Кравчук Э.С., Ганина Е.Б. Динамика изменчивости микробиоты полости рта и толстого кишечника юношей при перемене условий жизни. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(8): 507-12. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-8-507-512.
4. Щеголев С.Ю., Кленин В.И. Определение параметров сложных дисперсных полимерных систем из спектра мутности; *Высокомолекулярные соединения*; 1971; А13(12): 2809-15.
5. Рамазанов К.Р., Хлебцов Н.Г., Щеголев С.Ю., Кленин В.И. Характеристические функции светорассеяния полидисперсных систем. *Коллоидный журнал*. 1983, 45(3): 473-9.

6. Нестеров А.Н. Кинетика и механизм гидратообразования газов в присутствии поверхностно-активных веществ. Дис. ... д-ра. хим. наук. Тюмень; 2006.

REFERENCES

1. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Kravchuk E.S., Ganina E.B. Dynamics of variability of the microbiota of the oral cavity and large intestine of young men under changing living conditions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* 2019; 64(8): 507-12. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-8-507-512. (in Russian)
2. Yu C., Irudayara J., Debroy C., Schmilovitch Z., Mizrach A. Spectroscopic Differentiation and Quantification of Microorganisms in Apple Juice. *Journal of Food Science*. 2006; 69(7): 268–72. DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.t.
3. Lee J., Kim H-S., Jo H.Y., Kwon M.J. Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent and -independent methods. *PLoS One*. 2021; 16(2). DOI:10.1371/journal.pone.0246142. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0246142>.
4. Shchegolev S.Yu., Klenin V.I. Determination of the parameters of complex dispersed polymer systems from the turbidity spectrum. *Vysokomolekulyarnye soedineniya*. 1971; A13(12): 2809-15. (in Russian)
5. Ramazanov K.R., Khlebtsov N.G., Shchegolev S.Yu., Klenin V.I. Characteristic functions of light scattering of polydisperse systems. *Kolloidnyy zhurnal*. 1983; 45(3): 473-9. (in Russian)
6. Nesterov A.N. Kinetics and mechanism of hydrate formation of gases in the presence of surfactants. Diss. Tyumen'; 2006. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Шаров Т.Н., Будченко А.А., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВИРУСОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, Волгоград, Россия

Актуальность проблемы своевременной диагностики вирусных инфекций в настоящее время сложно переоценить. По данным ВОЗ, ежегодно регистрируются десятки вспышек заболеваний вирусной природы как в развивающихся, так и в развитых странах. При этом только один вирус сезонного гриппа способен поражать до 20% населения даже в европейских странах с высоким уровнем медицины. Ежегодное количество смертей по причине вирусных инфекций согласно официальной статистике превышает 600 тыс. человек по всему миру. Расширение арсенала надёжных и достаточно быстрых методов диагностики вирусных заболеваний позволило бы внести значительный вклад в снижение показателей заболеваемости и смертности. Молекулярно-генетические методы в данный момент остаются наиболее распространённым способом идентификации вирусов в клинической лабораторной диагностике, однако они обладают рядом недостатков, таких как необходимость проведения диагностических исследований в специализированных условиях. В связи с этим имеющийся спектр инструментов для идентификации и исследования опасных для человека вирусов нуждается в постоянном дополнении и усовершенствовании. Метод MALDI-ToF масс-спектрометрии сочетает в себе степень точности и универсальности, достаточные как для идентификации клинических штаммов, выделенных от больных, так и для изучения фенотипических свойств вирусов в условиях исследовательских лабораторий и центров. Приведена и обобщена основная информация об уже существующем или потенциально возможном применении метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации вирусов.

Ключевые слова: времяпролетная масс-спектрометрия; вирусы; протеомный анализ.

Для цитирования: Шаров Т.Н., Будченко А.А., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение масс-спектрометрического метода для изучения и идентификации клинически значимых вирусов (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 480-483. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-480-483>

Для корреспонденции: Шаров Тимур Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. протеомного анализа; e-mail: timursharov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 28.03.2022

Принята к печати 27.05.2022

Опубликовано 15.08.2022

Sharov T.N., Budchenko A.A., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

THE APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY METHOD FOR THE STUDY AND IDENTIFICATION OF MEDICALLY IMPORTANT VIRUSES (REVIEW OF LITERATURE)

Federal Government Health Institution «Volgograd Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

It is difficult to overestimate the urgency of the problem of well-timed diagnosis of viral infections. According to the WHO, dozens of outbreaks of viral diseases are recorded annually, both in developing and developed countries. Moreover, the seasonal flu virus alone is capable of infecting up to 20% of the population, even in European countries with a high level of medicine. And the annual number of deaths due to viral infections, according to official statistics, exceeds 600 thousand people around the world. That's why the provision of a reliable and fairly rapid diagnosis of viruses, along with subsequent therapy, makes a significant contribution to reducing the incidence of mortality. Despite the fact that PCR-based methods currently remain the most common method for identifying viruses in clinical practice, as recent experience shows, in addition to the already known disadvantages, in the event of large outbreaks, such test systems may simply not be in the required amount. In this regard, it is necessary to supplement and improve the existing tools for identification and research of clinically significant viruses. The MALDI-TOF mass spectrometry method combines a degree of accuracy and versatility, sufficient both for the identification of clinical strains isolated from patients, and for the study of the phenotypic properties of viruses in research laboratories and centers. This article presents and summarizes the main data on the existing or potential application of the method of time-of-flight mass spectrometry with matrix-associated laser desorption / ionization for the identification or study of viruses.

Key words: time-of-flight mass spectrometry; viruses; proteomic analysis.

For citation: Sharov T. N., Budchenko A. A., Viktorov D. V., Toporkov A. V. The application of mass spectrometry method for the study and identification of medically important viruses (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 480-483 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-480-483>

For correspondence: Sharov T.N., Cand. Sci. Med., senior researcher of the laboratory of proteome analysis; e-mail: timursharov@gmail.com

Information about authors:

Sharov T.N., <https://orcid.org/0000-0002-7906-1708>;
Budchenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-8346-8500>;
Viktorov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>;
Toporkov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.03.2022

Accepted 27.05.2022

Published 15.08.2022

Быстрая и точная идентификация возбудителя, в том числе вирусной природы, во многих случаях критически важна для выбора терапии, последующей оценки её эффективности и корректировки, прогноза заболевания в целом [1]. Схожесть клинических признаков многих вирусных инфекций различной этиологии делает лабораторный анализ важнейшей частью их диагностики [2]. Соответственно, совершенствование имеющихся методов идентификации вирусов, вызывающих у человека заболевания, постоянный поиск новых диагностических инструментов является актуальным аспектом как для специалистов медицинских учреждений, так для научных сотрудников в исследовательских центрах.

Метод масс-спектрометрии применяется несколько десятилетий в большинстве областей человеческой деятельности, где требуется качественный или количественный анализ вещества [3–5], и имеет свои устоявшиеся ниши, как в клинической лабораторной диагностике, так и в сфере фундаментальных или прикладных исследований. Вре́мяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) нашла наибольшее применение в медицинских учреждениях, прежде всего, как инструмент скрининга большого количества образцов культур микроорганизмов, выделенных из клинического материала (кровь, раневое отделяемое). Масс-спектрометрический метод идентификации микроорганизма основан на выявлении полного спектра клеточных белков, формирующих индивидуальный для каждого вида или даже штамма профиль [6]. Чаще всего белковый профиль определяется консервативными рибосомальными белками, поскольку они представлены наиболее количественно [7]. В целом протеомный состав клетки микроорганизма может в различной степени варьироваться даже среди штаммов одного вида в зависимости от условий роста, наличия резистентности к антибиотикам и многих других факторов. Благодаря этому возможно определение таксономической принадлежности и свойств микроорганизма по его изменению в масс-спектрограмме [8]. Наличие пополняемых коммерческих баз данных масс-спектров, простота и дешевизна проведения анализа позволяют использовать MALDI-ToF MS в качестве рутинного метода наряду с бактериологическим или ПЦР-методами. К его недостаткам можно отнести, прежде всего, стоимость приобретения масс-спектрометров, необходимость наличия чистой культуры микроорганизма для анализа. Развитие технологии MALDI-ToF MS в течение последних лет, совершенствование оборудования и программного обеспечения для масс-спектрометрического анализа позволили свести перечисленные недостатки к минимуму. Функциональные линейки приборов в последние годы значительно расширились, что в совокупности позволя-

ет приобретать MALDI-ToF-анализаторы для решения конкретных задач даже не самым крупным диагностическим лабораториям и стационарам. Совершенствование методик выделения белковых компонентов микроорганизмов, аналитического программного обеспечения значительно расширяет возможности по анализу собственнo клинического материала, без предварительного получения чистой культуры микроорганизма [9]. Крупные коммерческие базы данных масс-спектров микроорганизмов регулярно дополняются и включают в себя референсные масс-спектры нескольких тысяч видов клинически значимых бактерий и микромицетов, в том числе, штаммы с различной вирулентностью и антибиотикорезистентностью [10–12].

С самого начала применения MALDI-ToF масс-спектрометрии для определения видовой принадлежности микроорганизмов отдельным пунктом стоял вопрос идентификации вирусов [13]. Строение вирионов, особенности их культивирования делают крайне затруднительным проведение прямого белкового профилирования, как в случае с бактериями или микромицетами. Капсиды вирионов могут содержать в своем составе от нескольких десятков до сотни видов белков [14], однако за счёт небольшого размера количество материала для анализа в них очень мало в сравнении, например, с бактериями. Даже при использовании такого чувствительного метода, как MALDI-ToF масс-спектрометрия, для идентификации требуется относительно высокая концентрация вирионов в исследуемом материале [15]. Для культивирования вирусов необходимы специальные клеточные линии, имеющие собственные белки. Чтобы получить масс-спектр вирусных частиц, их необходимо отделить от компонентов культуры клеток, что представляет собой сложную задачу даже для исследовательской лаборатории [16].

В масс-спектрометрическом методе изучения и идентификации вирусов можно выделить два раздела: идентификацию отдельных компонентов вируса белковой природы после процедуры предварительной пробоподготовки и прямое определение белкового профиля вируса в клиническом материале.

В первом случае наиболее широко применяется выделение и очистка компонентов вирусов с помощью аффинной хроматографии. Инактивированный лизат клеток, заражённых исследуемым вирусом, инкубируют со специально подобранным лигандом, иммобилизованным на носителе, как правило, на полимерных гранулах. После элюции и ферментативной обработки белковую смесь разделяют и исследуют с помощью жидкостной хромато-масс-спектрометрии, что позволяет идентифицировать десятки белков из общей смеси за один этап. В работе описан эксперимент по детекции вирусных белков методом MALDI-ToF MS и использованию поис-

ковой машины MASCOT [17]. Путём подбора оптимального метода пробоподготовки, лигандов для аффинной хроматографии, исследователи выделили специфичные белки, участвующие во взаимодействии с организмом, а затем определили их структуру с помощью масс-анализатора [17]. Схожая работа проведена Z.H. Davis и соавт. [18]: при анализе вирусных компонентов методом сопоставления масс-спектров выделенных белков удалось определить протеомный состав исследуемого вируса, построить карту белок-белкового взаимодействия организма больного и различных вирусов (герпесвирус, вирус иммунодефицита человека). Используя данный метод, выделены белки вируса гепатита С, специфически взаимодействующие с гепатоцитами при поражении печени [19]. Во всех описанных случаях итоговый анализ массивов данных проведён с помощью специального программного обеспечения для статистической обработки.

В последнее десятилетие усилия многих исследователей направлены на поиск возможности идентифицировать возбудителей инфекционных заболеваний напрямую в клиническом материале. Наибольших успехов удалось достичь при анализе бактериальных белков. Использование специальных протоколов для выделения, хромато-масс-спектрометров для разделения компонентов смеси, в сочетании с базами данных бактериальных масс-спектров позволяет проводить идентификацию бактерий в образцах крови. Даже в этом случае точность идентификации может варьировать от 60 до 90% [20]. А при детекции вируса в крови или моче к проблеме интерпретации масс-спектра добавляется малое количество собственно вирусных белков на общей спектрограмме. Основная масса работ в данной области подразумевает предварительную хроматографическую очистку или разделение компонентов клинического материала [21]. Вопрос о потенциально возможных методах определения белкового состава вирусных частиц в клиническом материале остается актуальным, поскольку во многих случаях нет ни времени, ни возможности проводить выделение отдельных вирусных компонентов.

Изучена возможность создания собственного массива характеристических масс-пиков SARS-CoV-2, в исследовании проанализирована значительная выборка масс-спектров (свыше 300) образцов клинического материала, часть из которых выделена от больных с диагнозом COVID-19, подтверждённым результатами ПЦР-анализа [22]. Предварительную обработку материала осуществляли как в стандартном методе пробоподготовки возбудителей III-IV групп патогенности для анализа методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. Данные о характеристиках массовых пиков в получившемся спектре анализировали с помощью программного обеспечения для выявления масс-спектрометрических биомаркёров. Одной из отличительных особенностей данной работы стало использование авторами не только стандартных тестов на корреляцию (критерий Вилкоксона, дисперсионный тест), но и машинного обучения для создания моделей автоматической классификации пиков с помощью алгоритма «k-ближайшего соседа». По результатам определено, что специфичность метода - 71%, точность - 68% [22].

Данная работа представляется очень важной, поскольку, в отличие от множества предшествующих исследований в направлении масс-спектрометрической идентификации вирусов, авторы впервые сделали упор

не на этап пробоподготовки, а на обработку и анализ информации о масс-спектрах с помощью технологии машинного обучения, что позволило исключить значительную часть неинформативных массовых пиков. Такой подход обладает большим потенциалом благодаря тому, что за последние годы методы биоинформатики и обработки данных значительно продвинулись вперед. Хотя показатели точности и чувствительности в описанном методе пока не столь велики, как у ПЦР, это значительный прогресс, поскольку ранее прямое профилирование вирусов методом MALDI-ToF с приемлемым уровнем достоверности вообще представлялось маловероятным. Дальнейшие исследования в этом направлении, несомненно, поспособствуют повышению точности и специфичности анализа.

Отдельно следует выделить использование масс-спектрометрического анализатора в качестве точного детектора молекулярной массы получившихся продуктов реакции амплификации. Наиболее широко известным способом такого применения масс-спектрометрии служит детекция однонуклеотидных полиморфизмов (SNP-анализ), хорошо зарекомендовавшая себя в течение последних лет [23]. В данном методе проводят амплификацию генетического материала вируса, а с помощью времяпролетного масс-спектрометра с MALDI-ионизацией осуществляется идентификация продукта амплификации в виде появления рассчитанного массового пика в сравнении с отрицательным контролем. Точности прибора достаточно для выявления разницы масс в один нуклеотид, а сам метод относительно быстрый и менее трудоёмкий по сравнению с обычным для SNP-анализа способом регистрации результата. Масс-спектрометрический способ детекции позволяет отказаться от специфической флуоресцентной метки, проводить несколько реакций элонгации праймеров в одной пробирке [24]. При применении метода MALDI-ToF масс-спектрометрии для определения молекулярной массы продуктов амплификации удалось не только выявить вирус SARS-CoV в клиническом материале, но и достичь большей точности по сравнению с обычным методом детекции [25]. Результаты работ в данном направлении свидетельствуют об эффективности использования масс-спектрометрического метода в лабораторной диагностике вирусов даже во вспомогательной роли.

По результатам анализа представленных данных из разных источников литературы можно сделать заключение, что масс-спектрометрический метод демонстрирует значительный потенциал в области идентификации клинически значимых вирусов. В совокупности с алгоритмом машинного обучения, методом многофакторного анализа и статистической постобработкой данных, протеомный анализ выходит за рамки традиционных ниш его использования и может стать быстрым и надёжным инструментом в области вирусологических исследований. Следует отметить растущую роль биоинформационного анализа как в протеомике в целом, так и в области фундаментального и прикладного изучения микроорганизмов и их взаимодействия с организмом человека. Современные методы исследования оперируют большими массивами информации, обработка и анализ которых невозможны без специализированного программного обеспечения, наличия как минимум базовых знаний из областей информатики и статистики. Существующая тенденция к частичной автоматизации

расчётов, дополнение белковых и геномных баз данных, использование технологий машинного обучения, несомненно поспособствуют дальнейшему развитию в области протеомного анализа вирусов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Carolina Scagnolari, Ombretta Turriziani, Katia Monteleone, Alessandra Pierangeli, Guido Antonelli. Consolidation of molecular testing in clinical virology. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2017; 15(4):387-400. DOI: 10.1080/14787210.2017.1271711. Epub. 2016 Dec 24.
2. Naru Zhang, Lili Wang, Xiaoqian Deng, Ruiying Liang, Meng Su, Chen He et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J. Med. Virol.* 2020; 92(4):408-17. DOI: 10.1002/jmv.25674. Epub. 2020 Feb 4.
3. Bittremieux W., Tabb D.L., Impens F., Staes A., Timmerman E., Martens L., Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2018 Sep; 37(5):697-711. DOI: 10.1002/mas.21544. Epub. 2017 Sep 7.
4. Jannetto P.J., Danso D. Mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 2020 Aug; 82:1. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2020.06.003. Epub. 2020 Jun 5.
5. Savaryn J.P., Toby T.K., Kelleher N.L. A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics.* 2016 Sep; 16(18): 2435-43. DOI: 10.1002/pmic.201600113. Epub. 2016 Aug 24.
6. Pu F., Chiang S., Zhang W., Ouyang Z. Direct sampling mass spectrometry for clinical analysis. *Analyst.* 2019 Feb 11;144(4):1034-51. DOI: 10.1039/c8an01722k.
7. Sandrin T. R., Demirev P. A. Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2018 May; 37(3):321-49. DOI: 10.1002/mas.21534. Epub. 2017 May 16.
8. Saleh S., Staes A., Deborggraeve S., Gevaert K. Targeted Proteomics for Studying Pathogenic Bacteria *Proteomics.* 2019 Aug; 19(16):e1800435. DOI: 10.1002/pmic.201800435. Epub. 2019 Jul 25.
9. Hou T., Chiang-Ni C., Teng S. Current status of MALDI-ToF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug. Anal.* 2019 Apr; 27(2):404-14. DOI: 10.1016/j.jfda.2019.01.001. Epub. 2019 Jan 31.
10. Fernández-Esgueva M., Fernández-Simon R., Monforte-Cirac M.L., López-Calleja A., Fortuño B., Viñuelas-Bayon J. Use of MALDI-ToF MS (Bruker Daltonics) for identification of Mycobacterium species isolated directly from liquid medium. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl. Ed).* 2021 May;39(5):241-3. DOI: 10.1016/j.eimc.2020.05.011. Epub. 2020 Jun 12.
11. Heireman L., Patteet S., Steyaert S. Performance of the new ID-fungi plate using two types of reference libraries (Bruker and MSI) to identify fungi with the Bruker MALDI Biotyper. *Med. Mycol.* 2020 Oct 1; 58(7):946-57. DOI: 10.1093/mmy/myz138.
12. Pinheiro D., Monteiro C., Faria M. A., Pinto E. Vitek ® MS v3.0 System in the Identification of Filamentous Fungi. *Mycopathologia.* 2019 Oct; 184(5):645-51. DOI: 10.1007/s11046-019-00377-0. Epub. 2019 Sep 10.
13. Ashcroft A. E. Mass spectrometry-based studies of virus assembly. *Current Opinion in Virology.* 2019; 36: 17-24.
14. Bucci M. Capsids under pressure. *Nature Chemical Biology.* 2018 Feb 14; 14:199. DOI:10.1038/nature25438 (2018).
15. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S. MALDI-ToF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015 Aug 5; 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. eCollection 2015.
16. Sviben D., Forcic D., Halassy B., Allmaier G., Marchetti-Deschmann M., Bergles M. Mass spectrometry-based investigation of measles and mumps virus proteome. *Virol. J.* 2018 Oct 16;15(1):160. DOI: 10.1186/s12985-018-1073-9.
17. Wang L., Ding X., Xiao J., Jiménez-Góngora T., Liu R., Lozano-Durán R. Inference of a Geminivirus-host protein-protein interaction network through affinity purification and mass spectrometry analysis. *Viruses.* 2017 Sep 25; 9(10):275. DOI: 10.3390/v9100275.
18. Davis Z. H., Verschueren E., Jang G. M. Global mapping of herpesvirus-host protein complexes reveals a transcription strategy for late genes. *Mol. Cell.* 2015 Jan 22; 57(2):349-60. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.11.026. Epub. 2014 Dec 24.
19. Ramage H. R., Kumar G. R., Verschueren E., Johnson J. R. A combined proteomics/genomics approach links hepatitis C virus infection with nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell.* 2015 Jan 22; 57(2): 329-40. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.12.028.
20. Nomura F., Tsuchida S., Murata S., Satoh M. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clinical Proteomics.* 2020 May 13; 17: 14. DOI:10.1186/s12014-020-09278-7.
21. Mahmud I., Garrett T. J. Mass Spectrometry techniques in emerging pathogens studies: COVID-19 perspectives. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2020 Sep 3; 31(10). DOI:10.1021/jasms.0c00238.
22. Rocca M. F., Zintgraf J. C., Datteroc M. E., Santos L. S. A combined approach of MALDI-ToF mass spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs. *J. Virol. Methods.* 2020 Dec; 286: 113991. DOI: 10.1016/j.jviromet.2020.113991.
23. Liu N., Wang L., Cai G., Zhang D., Lin J. Establishment of a simultaneous detection method for ten duck viruses using MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Virol. Methods.* 2019 Nov; 273:113723. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113723. Epub 2019 Aug 17.
24. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P. K., Virdi J. S. MALDI-ToF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 2015 Aug 5; 6:791. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00791. eCollection 2015.
25. Xiu L., Zhang C., Wu Z. Establishment and application of a universal coronavirus screening method using MALDI-ToF mass spectrometry. *Front. Microbiol.* 2017 August 09; 8:1510. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01510.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ильин В.К.¹, Соловьёва З.О.¹, Гизингер О.А.², Шеблаева А.С.¹, Быстрова О.В.³, Ловцевич С.М.³, Бородин И.П.⁴

СРАВНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДИАГНОСТИКИ И МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЁРОВ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ОЦЕНКЕ МИКРОБИОТЫ ПОЛОСТИ РТА

¹ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Россия;

²ФГБУ ВО Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, 117198, Москва, Россия;

³ООО «Институт аналитической токсикологии», 143441, Московская область, Россия;

⁴ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

Для оперативной диагностики, в том числе зубочелюстной системы, необходима разработка быстрых информативных методов оценки видового и количественного состава микрофлоры покровных тканей пародонта и ротоглотки. Использование классического бактериологического метода занимает до 5 суток, в результате чего срок получения необходимой информации значительно откладывается, что затрудняет проведение оперативных лечебных мероприятий. Поиск средств и методов оперативного микробиологического контроля является актуальным. Работа посвящена обоснованию применения технологии МСММ (масс-спектрометрии микробных маркёров) в качестве средства микробиологического контроля пародонта и других биотопов ротоглотки.

Ключевые слова: пародонт; метод масс-спектрометрии микробных маркёров; метод полимеразной цепной реакции.

Для цитирования: Ильин В.К., Соловьёва З.О., Гизингер О.А., Шеблаева А.С., Быстрова О.В., Ловцевич С.М., Бородин И.П. Сравнение метода ПЦР диагностики и метода масс-спектрометрии микробных маркёров применительно к оценке микробиоты полости рта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 484-488. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-484-488>

Для корреспонденции: Шеблаева Анна Сергеевна, науч. сотр. лаб. микробной экологии человека; e-mail: anna@sheblaeva.ru

Финансирование. Работа выполнена по базовой тематике РАН № 64.2. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.02.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 15.08.2022

Ilyin V.K.¹, Solovieva Z.O.¹, Gizinger O.A.², Sheblaeva A.S.¹, Bystrova O.A.³, Lovtsevitch S.M.³, Borodin I.P.⁴

COMPARISON OF PCR DIAGNOSTIC METHOD AND MASS SPECTROMETRY OF MICROBIAL MARKERS METHOD AS APPLIED TO THE EVALUATION OF ORAL MICROBIOTA

¹Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 123007, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) 117198, Moscow, Russia;

³Institute of Analytical Toxicology, 125466, Krasnogorsk, Moscow region, Russia;

⁴Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

Rapid informative methods for assessing the species and quantitative composition of the microflora of the periodontal and oropharyngeal covering tissues are necessary for operative diagnostics, including those of the dentofacial system. The use of classical bacteriological methods, including seeding, incubation, counting and identification of microorganisms takes up to 5 days, resulting in a significant delay in obtaining the necessary information, which makes it difficult to carry out operative treatment measures. Therefore, the search for means and methods of operative microbiological control is urgent. The present work is devoted to substantiation of MSMM (mass spectrometry of microbial markers) technology application as a means of microbiological control of periodontal and other oropharyngeal biotopes.

Key words: periodontium; microbial marker mass spectrometry method; polymerase chain reaction method.

For citation: Ilyin V.K., Solovieva Z.O., Gizinger O.A., Sheblaeva A.S., Bystrova O.A., Lovtsevitch S.M., Borodin I.P.

Comparison of pcr diagnostic method and mass spectrometry of microbial markers method as applied to the evaluation of oral microbiota. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 484-488 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-484-488>

For correspondence: Sheblaeva A.S., Researcher, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems; e-mail: anna@sheblaeva.ru

Information about authors:

Ilyin V.K., <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>;
Solovieva Z.O., <https://orcid.org/0000-0002-6159-1313>;
Gizinger O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9302-0155>;
Sheblaeva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-4083-9612>;
Bystrova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6829-8147>;
Lovtsevich S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8090-5851>;
Borodin I.P., <https://orcid.org/0000-0002-0231-9600>.

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

Acknowledgment. The work was carried out on the basis of the basic theme of the Russian Academy of Sciences No. 64.2. This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Received 04.02.2022

Accepted 25.04.2022

Published 15.08.2022

Введение. Пародонт первым отвечает на условия стресса и снижения иммунной реактивности организма в виде воспаления полости рта, что, в дальнейшем, может привести к расшатыванию зубов и их потере, нарушению архитектоники полости рта [1].

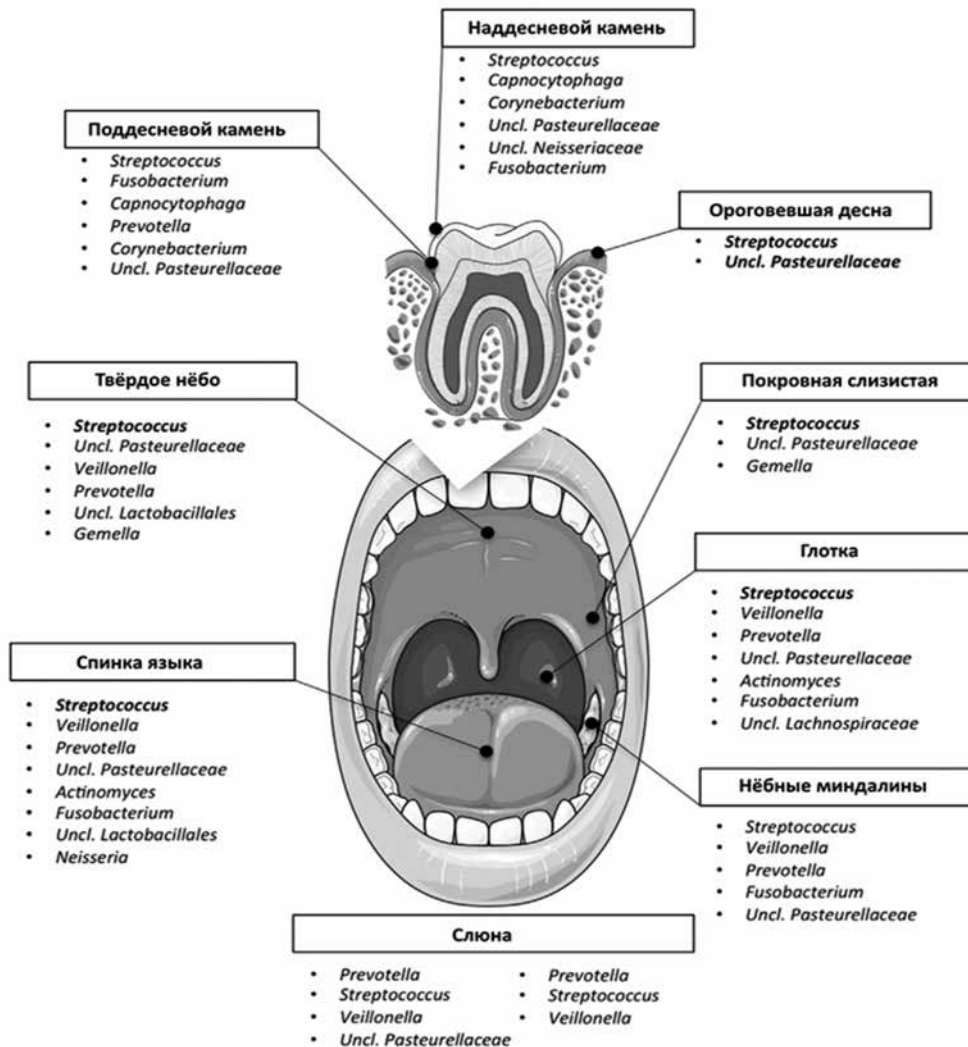
Воспалительные реакции в области пародонта – явление достаточно частое и встречается среди 80-100% населения независимо от территории проживания [2]. Следствием воспаления пародонта может быть нарушение микробиоценоза полости рта. Микробиоценоз полости рта является сложной динамической системой, где организм хозяина и микробы адаптированы друг к другу и при наличии хронического воспалительного процесса, явлений оксидативного стресса это взаимодействие может быть нарушено. Другими значимыми причинами нарушения микробиоценоза полости рта могут быть кариесогенные процессы, механическое и химическое отбеливание для улучшения внешнего вида, удаление зубов, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания верхних дыхательных путей как в анамнезе так и в текущий период времени, профессио-

нальные вредности, наличие у больных профессий, связанных с нервно-эмоциональным напряжением (космонавты, моряки дальнего плавания, подводники, жители Заполярья) и т. д. [3-6].

Микрофлора полости рта традиционно подразделяется на аутохтонную и аллохтонную. Аутохтонная микрофлора принимает участие в метаболических процессах организма [7]. В 2016 г. описан состав микробиоты полости рта, наиболее часто встречающейся у >80% людей [12] (см. рисунок).

По современным представлениям основными «провокаторами» или индукторами дисбиотических процессов полости рта, приводящими к заболеваниям пародонта, являются: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* [8-10] *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces* spp., *Candida* spp., условно патогенные микроорганизмы (УПМ):

Видовой состав микрофлоры содержимого пародонтальных карманов при обострении хронического генерализованного пародонтита представлен в табл. 1 [11].



Ключевая микробиота полости рта, установленная в рамках инициативы Human Microbiome Project. Курсивом выделены таксоны, распространённые у >75% людей и составляющие >10% всех бактерий сообщества.

Streptococcus sanguis, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Candida glabrata* [11].

Таблица 1

Видовой состав микрофлоры содержимого пародонтальных карманов

Вид	Количество штаммов, абс.	Удельный вес, %	Частота встречаемости, %
Стрептококки			
<i>S. mitis</i>	31	17,21±1,12	61,35±1,56
<i>S. mutans</i>	30	16,67±1,34	62,48 ± 1,45
<i>S. agalactis</i>	26	14,44±1,22	50,80±1,45
<i>S. salivarius</i>	23	12,78±1,34	47,64±1,14
<i>S. sanguis</i>	17	9,44±1,56	34,39±1,04
Стафилококки			
Коагулазоположительные	11	6,11±1,56	22,22±1,09
Коагулазоотрицательные	10	5,56±1,26	23,75±1,56
Дрожжеподобные грибы	21	11,68±1,33	41,79±1,76
Коринебактерии	11	6,11±1,65	23,45±1,89
Всего	180	100	

Для индикации и последующей идентификации микроорганизмов используется культуральный метод диагностики [14], иммунологические и биохимические методы идентификации [15]. Каждая из методик, используемых в диагностике, имеет свои преимущества и ограничения, определяющие её выбор и место в конкретной диагностической стратегии. Базовыми требованиями к любому методу индикации микроорганизмов являются: простота взятия биоматериала, быстрая обработка и валидный результат, то есть точность выполнения преаналитического, аналитического и постаналитического лабораторного этапов.

Для идентификации микроорганизмов часто применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью которой даже небольшое количество исследуемого материала, содержащего генетический материал ДНК, РНК можно идентифицировать путём амплификации [16]. ПЦР позволяет с высокой точностью, до 10 копий на 1 мл биоматериала, определять пародонтопатогены в образцах биоматериала. Проблема заключается в том, что при исследовании методом ПЦР, часто, приходится сужать перечень микроорганизмов для идентификации, оптимизируя временные и финансовые затраты на проведение анализа, исходя из возможностей тест-систем производителя.

Для идентификации пародонтопатогенов начал использоваться метод масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ), ранее показавший эффективность в гастроэнтерологии, хирургии и трансплантологии, отоларингологии, кардиологии, урологии, гинекологии и др. [17-25], где обосновано его применение и доказана информативность и целесообразность его использования. Метод МСММ можно отнести к молекулярно-биологическим исследованиям, однако целевыми молекулярными соединениями для диагностических целей являются специфические генетически детерминированные компоненты клеточных стенок микроорганизмов. Метод МСММ имеет высокую (до 98%) чувствительность, даёт возможность валидации результатов и анализа микроорганизмов, полученных из любого биоматериала. В отличие от метода ПЦР МСММ имеет меньше ограничений по отбору и транспортировке

проб, нарушение которых может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам анализа. Ограничение применения метода МСММ связано со сходством строения клеточных стенок микроорганизмов и необходимостью специфических маркеров для видовой дифференциации, с учётом вышеозначенного обстоятельства, в то время как метод ПЦР обладает специфичностью в пределах 98,5%.

В отличие от метода ПЦР, метод МСММ является одновременно и скрининговым, так как позволяет одновременно определять 57 микроорганизмов в одной пробе одновременно [26], и экспрессным, поскольку полный спектр микроорганизмов может быть доступен через 2 ч после поступления биоматериала в лабораторию. Представляется обоснованным применение метода МСММ для изучения микробного сообщества для идентификации патогенных микроорганизмов и УПМ резидентной микрофлоры, и для обоснованного назначения дополнительных исследований с использованием метода ПЦР.

Цель исследования – сравнение эффективности, специфичности и чувствительности методов ПЦР и МСММ для изучения видового и количественного состава микробиоты полости рта.

Материал и методы. Исследование проведено на базе Медицинского института РУДН в 2021 г. в соответствии с решением Комитета по этике Медицинского института РУДН от 17 марта 2021 г. (выписка из протокола № 5). В исследование включены 20 лиц, разнородных по гендерному составу: 10 мужчин (50%) и 10 женщин (50%) в возрасте от 27 до 65, отмечены хронические заболевания в стадии компенсации: гипертония – у 1 обследуемого (5%), заболевания ЖКТ – у 1 (5%). Исследование проведено на основании добровольного информированного согласия в соответствии с основами законодательства РФ «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ».

При отборе проб для проведения тестирования методом ПЦР использован стерильный стоматологический бумажный пин, с его помощью отбирались пробы в области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. При отборе проб методом МСММ использованы одноразовые стерильные зонды с тампоном в пробирке без среды, пробы отбирались в той же области, то есть с области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. ДНК микроорганизмов выделили с помощью набора реагентов «Пробоподготовка универсальная» (ООО НПФ «Генлаб», Россия). Амплификация маркеров пародонтопатогенных бактерий *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, проведена в термоциклере «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) с помощью мультипраймерного ПЦР набора «Мультидент-5» (ООО НПФ «Генлаб», Россия).

Исследование методом МСММ проведено с использованием газового хроматографа масс-спектрометра (ГХ-МС) «МАЭСТРО» (ООО «Интерлаб», Россия). Микробные маркеры извлечены из зонд-тампонов, подвергнуты кислоту метанолизу при температуре 80° С в течение 45 мин (0,4 мл 1,2 МНСl/MeOH) с последующей экстракцией гексаном (1 часть смеси х 400 мкл гексана) с последующим высушиванием и дериватизацией полученных продуктов обработкой 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида при 80° С в течение 5 минут. Полученная смесь проанализирована на ГХ-МС системе в

программируемом режиме разделения компонентов в температурном градиенте [135-320]°C со скоростью подъёма температуры на 7° C в минуту на колонке с фазой из 5% фенилметилполисилоксана (30 мх0,25ммх0,25 мкм). Ионизацию проводили электронным ударом, при параметрах удара 70 эВ, детектирование в режиме селективных ионов. В ходе исследования методом ПЦР и МСММ детектированы: *Prevotella* spp., *Candida* spp., *Porphyromonas gingivalis*. Все полученные данные проанализированы путём вычислений в строгом соответствии с зарегистрированной медицинской технологией для данной процедуры (Разрешение Росздравнадзора ФС 2010/038 от 24.02.2010 г.). Качественные и количественные показатели подвергнуты статистической обработке с использованием методов непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 365. Статистический анализ проведён с использованием свободной программной среды статистических вычислений R (v.3.5.1). В связи с тем, что методы ПЦР и МСММ используют разные шкалы и пороговые значения для выделения клинически значимых результатов, проведена нормализация статистических данных с округлением до половины порядка для выравнивания количественных показателей. Поскольку метод МСММ имеет более низкие пороги чувствительности, в некоторых случаях это было причиной положительных результатов метода МСММ при отрицательных результатах метода ПЦР. Для сравнения относительных показателей, характеризующих связанные совокупности данных, использован критерий Мак-Немара, что продиктовано необходимостью независимости наблюдений в силу использования одних и тех же испытуемых, учёт признака выполняется на одних и тех же субъектах. Критерий Мак-Немара рассчитывался по формуле:

$$Q = b - c^2 / (b + c),$$

где: Q – значение критерия Мак-Немара, b – число исследуемых с отрицательным результатом при первом наблюдении и положительным – при втором (в нашем случае результатом являлось количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение), c – число исследуемых с положительным результатом при первом наблюдении и отрицательным – при втором. Значения Q критерия Мак-Немара интерпрети-

ровались путём сравнения с табличными критическими значениями с принятым уровнем значимости $p=0,05$. Нулевая гипотеза H_0 проверяла существование статистически значимых различий между двумя выборками.

Результаты и обсуждение. У 20 добровольцев-волонтеров взяты пробы биоматериала из полости рта, утром, натощак, с соблюдением правил преаналитического этапа, предположительно содержащих различные микроорганизмы. После пробоподготовки проведён анализ видового и количественного состава микроорганизмов методами ПЦР и МСММ.

Метод ПЦР показал наличие *Prevotella* spp. в количестве, превышающем клинически значимый порог, у 3 из 20 добровольцев-волонтеров (15%). Методом МСММ детектирована *Prevotella* spp. в количестве, превышающем клинически значимый порог у 5 обследуемых из 20 (20%), $p<0,05$. Наличие *Porphyromonas gingivalis* в пробах микробиоты ротовой полости детектировано методом ПЦР в 4-х случаях (20%), методом МСММ в 6-ти случаях (30%), $p<0,05$.

Наличие *Candida* spp. выявлено обоими методами в равном количестве, $p>0,05$. Результаты статистического анализа показали, что для всех исследуемых видов пародонтопатогенных микроорганизмов нулевую гипотезу о независимости результатов исследований методами ПЦР и МСММ можно отвергнуть с высоким уровнем значимости $p>0,05$. В табл. 2 «ПЦР+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР; «ПЦР-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР; «МСММ+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом МСММ; «МСММ-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом МСММ; Q – Значение распределения χ^2 для использования с критерием Мак-Немара с поправкой mid-P [23], p – критический уровень значимости при проверке статистической гипотезы.

При статистической обработке экспериментальных данных метод МСММ показал себя как более чувствительный при обнаружении пародонтопатогенов полости рта при сравнении с методом ПЦР, что позволяет рекомендовать его для диагностических алгоритмов и при проведении исследований в области стоматологии и микробиологии.

Заключение. Метод МСММ является эффективным для изучения видового и количественного состава микробиоты полости рта. Чувствительность МСММ не уступает методу ПЦР в индикации, идентификации и количественном анализе пародонтопатогенных микроорганизмов. Результаты, полученные методом МСММ, могут быть с большой достоверностью использованы в клинической практике.

Таблица 2

Таблица сопряжённости и результаты статистического анализа

Вид	ПЦР+/ПЦР-	МСММ+	МСММ-	Статистические показатели
<i>Prevotella</i> spp.	ПЦР+	2	1	$Q=0.025$, $p=0.671$
	ПЦР-	3	14	
	ПЦР-	4	1	
<i>Candida</i> spp.	ПЦР+	0	2	$Q=0$, $p=1$
	ПЦР-	2	16	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ПЦР+	1	3	$Q=0.125$, $p=0.7237$
	ПЦР-	5	11	

Примечание. ПЦР+/ПЦР- см. в тексте статьи, Q – значение распределения χ^2 для использования с критерием Мак-Немара с поправкой mid-P.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 7, 10, 14, 22 см. REFERENCES)

1. Стрельникова Н.В., Антонова А.А., Шаповаленко Е.С., Кислая А.И., Саргсян А.Г., Щегольская О.В. и др. Роль микробиологической идентификации условно-патогенных микроорганизмов слизистой оболочки языка при хронических пародонтитах. В кн.: Актуальные проблемы стоматологии детского возраста и ортодонтии. Сборник научных статей IX региональной научно-практической конференции с международным участием по детской стоматологии. Хабаровск; 2019:175-83.

- Гизингер О.А., Шетинин С.А. Мониторинг микрофлоры поверхности плоточной миндалины у детей с хроническим аденоидитом, проживающих на территории Челябинска. *Вестник оториноларингологии*. 2016; 81 (1):33-6.
- Зеленова Е. Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология. Нижний Новгород: Издательство НГМА; 2004.
- Ильин В. К., Шумилина Г.А., Соловьева З.О., Носовский А.М., Каминская Е.В. Некоторые показатели состояния полости рта и зубов космонавтов при полетах на международной космической станции. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2016; 50 (6): 25-30.
- Правосудова Н. А., Мельников В. Л. Микробиология полости рта. Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов. Пенза: ПГУ; 2013.
- Червинцев В. М., Червинцев Ю.В., Леонтьева А.В., Козлова Е.А., Стулов Н.М., Беляев В.С. и др. Микробиом полости рта у больных пародонтитом, адгезивные и биопленкообразующие свойства. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1): 45-51.
- Ушаков Р. В., Царёв В. Н. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы. М.: Практическая медицина; 2019.
- Мирсаева Ф. З., Ханов Т.В., Кузнецова Т.Н., Буйлова О.В. Видовой состав микрофлоры в содержимом пародонтальных карманов при обострении хронического генерализованного пародонтита. *Проблемы стоматологии*. 2018; 14(3):29-36.
- Гладин Д. П., Королюк А. М., Дробот И. В., Козлова Н. С., Анненкова И. Д. Полимеразная цепная реакция в микробиологии. *Российские биомедицинские исследования*. 2021; 6(3): 36-46.
- Годков М. А., Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Возможности масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторном мониторинге дисбиозов и инфекций. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 7: 35-44.
- Адеишвили П.С., Полеско И.В., Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Гусева Н.А., Колтунов И.Е. и др. Исследование микробиоценоза ротоглотки методом масс-спектрометрии микробных маркеров у детей с инфекционным мононуклеозом. *Детские инфекции*. 2012; 11(1):12-6.
- Власов А. А., Саликова С.П., Гриневич В.Б., Быстрова О.В., Осипов Г.А., Мешкова М.Е. Микробиота кишечника и системное воспаление у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. *Кардиология*. 2020; 60(5): 74-82.
- Крымцева Т. А., Осипов Г. А., Бойко Н. Б., Соколов Я. А., Демина А. М., Радюшина Т. В. и др. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2003; (2): 92-101.
- Винницкая Е.В., Лазебник Л.Б., Осипов Г.А., Дроздов В.Н. Спонтанный бактериальный перитонит и системная воспалительная реакция у больных циррозом печени. *Терапевтический архив*. 2011; 83(2): 47-52.
- Аврамов А.А., Ловцевич Н.В., Осипов Г.А. Мониторинг инфекционно-воспалительного процесса у реанимационных пациентов методом масс-спектрометрии микробных маркеров в крови и ликворе. *Поликлиника*. 2019; (4-1):31-9.
- Фёдорова Е.П., Осипов Г.А., Истомина О.А., Захаров Д.Д., Быстрова О.В. Установление расширенного состава микробного сообщества эндометрия при патологиях и значение данных в практике акушера-гинеколога. *Поликлиника*. 2021; (3): 34-9.
- Осипов Г.А., Быстрова О.В., Ловцевич С.М. Современный методический подход к неинвазивной оценке микрорекологического статуса человека методом масс-спектрометрии микробных маркеров. Комплексный подход коррекции нарушения микрорекологического статуса. *Терапевт*. 2020; (10): 53-9.
- Gizinger O.A., Shchetinin S.A. Monitoring of the microflora of the surface of the pharyngeal tonsil in children with chronic adenoiditis living in the territory of Chelyabinsk. *Vestnik otorinolaringologii*. 2016; 81 (1): 33-6. (in Russian)
- Zelenova E. G., Zaslavskaya M.I., Salina E.V., Rassanov S.P. Oral microflora: norm and pathology. Nizhniy Novgorod: Izdatel'stvo NGMA; 2004. (in Russian)
- Il'in V. K., Shumilina G.A., Solov'eva Z.O., Nosovskiy A.M., Kaminskaya E.V. Some indicators of oral and dental health of astronauts during flights on the international space station. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2016; 50 (6): 25-30. (in Russian)
- Pravosudova N. A., Mel'nikov V. L. Oral Microbiology. Textbook for students of medical universities [Mikrobiologiya polosti rta. Uchebno-metodicheskoe posobie]. Penza: Penzenskiy gosudarstvennyi universitet; 2013. (in Russian)
- Caffero C., Matarasso S. Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: the 5Ps age has already started. *EPMA Journal*. 2013; 4(1): 1-29.
- Chervinets V. M., Chervinets Yu. V., Leont'eva A. V., Kozlova E. A., Stulov N. M., Belyaev V. S. et al. Oral microbiome of periodontitis patients, adhesive and biofilm-forming properties. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(1): 45-51. (in Russian)
- Ushakov R. V., Tsarev V. N. Antimicrobial therapy in dentistry. Principles and algorithms. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2019. (in Russian)
- Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., Araujo, R. The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases. *Advances in applied microbiology*. 2016; 97:171-210.
- Mirsaeva F. Z., Khanov T.V., Kuznetsova T.N., Buylova O.V. Species composition of microflora in the contents of periodontal pockets in exacerbation of chronic generalized periodontitis. *Problemy stomatologii*. 2018; 14(3):29-36. (in Russian)
- Gladin D.P., Korolyuk A.M., Drobot I. V., Kozlova N.S., Annenкова I.D. Polymerase chain reaction in microbiology. *Rossiyskie biomeditsinskie issledovaniya*. 2021; 6(3): 36-46. (in Russian)
- Godkov M. A., Osipov G.A., Fedosova N.F., Lyadov K.V. Possibilities of mass spectrometry of microbial markers in laboratory monitoring of dysbiosis and infections *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2011; 7: 35-44. (in Russian)
- Ilyin V.K., Moukhamedieva L.N., Osipov G.A., Batov A. S., Soloviova Z.O., Mardanov R. M. et al. Non-cultural methods of human microflora evaluation for the benefit of crew medical control in confined habitat. *Acta Astronautica*. 2011; 68(9-10): 1529-36.
- Adeishvili P. S., Polesko I.V., Osipov G.A., Fedosova N.F., Guseva N.A., Koltunov I.E. et al. Study of oropharyngeal microbiocenosis by mass spectrometry of microbial markers in children with infectious mononucleosis. *Detskie infektsii*. 2012; 11(1):12-6. (in Russian)
- Vlasov A.A., Salikova S.P., Grinevich V.B., Byistrova O.V., Osipov G.A., Meshkova M.E. Gut microbiota and systemic inflammation in patients with chronic heart failure. *Kardiologiya*. 2020; 60(5): 74-82. (in Russian)
- Krymteva T.A., Osipov G.A., Boyko N.B., Sokolov Ya.A., Demina A.M., Radyushina T.V. et al. Minor fatty acids in urogenital body fluids and their significance in the diagnosis of inflammatory processes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (2): 92-101. (in Russian)
- Vinnitskaya E.V., Lazebnik L.B., Osipov G.A., Drozdov V.N. Spontaneous bacterial peritonitis and systemic inflammatory response in patients with liver cirrhosis. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2011; 83(2): 47-52. (in Russian)
- Avramov A.A., Lovtsevich N.V., Osipov G.A. Monitoring of infectious and inflammatory process in intensive care patients by mass spectrometry of microbial markers in blood and cerebrospinal fluid. *Poliklinika*. 2019; (4-1):31-9. (in Russian)
- Fedorova E.P., Osipov G.A., Istomin O.A., Zakharov D.D., Byistrova O.V. Establishment of the expanded composition of the endometrial microbial community in pathologies and significance of the data in obstetrician-gynecologist practice. *Poliklinika*. 2021;(3): 34-9. (in Russian)
- Osipov G.A., Byistrova O.V., Lovtsevich S.M. Modern methodological approach to noninvasive assessment of human microecological status by mass spectrometry of microbial markers. A comprehensive approach to the correction of microecological status disorders. *Terapevt*. 2020; (10): 53-9. (in Russian)
- Fagerland M.W., Lydersen S., Laake P. The McNemar test for binary matched-pairs data: mid-p and asymptotic are better than exact conditional. *BMC medical research methodology*. 2013; 13(1): 1-8.

REFERENCES

- Strel'nikova N.V., Antonova A.A., Shapovalenko E.S., Kislaya A.I., Sargsyan A.G., Shchegol'skaya O.V. et al. Role of microbiological identification of opportunistic microorganisms of the tongue mucosa in chronic periodontitis. Actual problems of pediatric dentistry and orthodontics. Collection of scientific articles of the IX regional scientific and practical conference with international participation on pediatric dentistry. Khabarovsk; 2019:175-83. (in Russian)
- Bernabe E., Marcenes W., Hernandez C.R., Bailey J., Abreu L.G., Alipour S. et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research*. 2020; 99(4):362-73.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Захарова Н.Б.¹, Годков М.А.², Долгов В.В.², Эмануэль В.Л.³, Гильманов А.Ж.⁴, Гладиллин Г.П.¹

УЧЕБНОЕ ВИДЕО ДЛЯ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИСТОВ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов, Россия;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 450008, Уфа, Россия

Адаптация образовательных программ в условиях ограничений в период пандемии коронавируса SARS-CoV-2 и после него основана на внедрении целого ряда новых образовательных технологий. В лекционный курс по клинической лабораторной диагностике внедряется гибридное обучение, практический курс претерпевает изменения за счёт создания виртуальных практических занятий с анализом результатов лабораторных исследований на основе историй болезни (кейс-технологий). Ключевым аспектом при внедрении кейсов в учебный процесс становится разработка видеоматериалов. Использование учебных видео-кейсов в процессе обучения специалистов клинической лабораторной диагностики при проведении циклов профессиональной переподготовки и повышения квалификации на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России получило положительную оценку курсантов. Создается «IVD-галерея» с размещением библиотеки учебных видео-кейсов для широкого использования при подготовке специалистов клинической лабораторной диагностики на профильных кафедрах.

Ключевые слова: гибридное образование; кейс-метод; библиотека учебных видео-кейсов.

Для цитирования: Захарова Н.Б., Годков М.А., Долгов В.В., Эмануэль В.Л., Гильманов А.Ж., Гладиллин Г.П. Учебное видео для подготовки специалистов клинической лабораторной диагностики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 489-492. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-489-492>

Для корреспонденции: Захарова Наталья Борисовна, д-р мед. наук, проф. каф. клин. лаб. диагностики; e-mail: lipidgormon@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2022

Принята к печати 26.05.2022

Опубликовано 15.08.2022

Zakharova N.B.¹, Godkov M.A.², Dolgov V.V.², Emanuel V.L.³, Gilmanov A.Zh.⁴, Gladilin G.P.¹

EDUCATIONAL VIDEO FOR TRAINING SPECIALISTS IN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS

¹Saratov State medical University n.a. V.I. Razumovsky, 410012, Saratov, Russia;

²Russian Medical Academy of Postgraduate Education Studies, 125993, Moscow, Russia;

³Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197022 Saint-Petersburg, Russia;

⁴Bashkortostan State Medical University, 450008, Ufa, Russia

The adaptation of educational programs under restrictions during the SARS-CoV-2 coronavirus pandemic and after it is based not only on the widespread use of video lectures, but also on the introduction of a number of new educational technologies. Hybrid learning will become the cornerstone of future educational technologies in clinical laboratory diagnostics and will contribute to the creation of virtual practical classes with examples of analysis of laboratory testing results based on case histories (Case Technologies). The key aspect in the implementation of video cases into the educational process is the development of video materials. The use of educational video cases developed by Vector-Best in the process of training specialists in clinical laboratory diagnostics during the cycles «Retraining» and «General Improvement» at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of the Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky of the Ministry of Health of Russia was a convenient format and received positive assessment of cadets. Currently, the «IVD gallery» section has appeared on the FLM website and the placement of an additional educational resource – a library of educational video cases.

Key words: clinical laboratory diagnostics; case method; hybrid education; educational video cases.

For citation: Zakharova N.B., Godkov M.A., Dolgov V.V., Emanuel V.L., Gilmanov A.Zh., Gladilin G.P. Educational video for training specialists in clinical laboratory diagnostics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 489-492 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-489-492>

For correspondence: Zakharova N.B., Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Doctor of Medical Science; e-mail: lipidgormon@mail.ru

Information about authors:

Zakharova N.B., <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>;
Godkov M.A., <https://orcid.org/0000-0001-9612-6705>;
Dolgov V.V., <https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>;
Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>;
Gilmanov A.Zh., <https://orcid.org/0000-0003-0996-6189>;
Gladilin G.P., <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>.

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 19.05.2022

Accepted 26.05.2022

Published 15.08.2022

Адаптация образовательных программ в условиях ограничений, связанных с пандемией COVID-19 и её последствиями, в своей основе предполагает широкое использование видеозаписей лекций, сопровождающихся презентациями, внедрение ряда новых образовательных технологий, гибридное обучение в формате online и offline, активное использование специальной техники [1–3].

Обучение и повышение квалификации в удалённом формате – реальность сегодняшнего дня (см. рисунок). Гибридное обучение способствует созданию и разработке виртуальных практических занятий по клинической лабораторной диагностике с примерами анализа результатов лабораторных исследований на основе историй болезни и кейс-технологий (Case Based Learning) [4, 5].

Кейс-технологии вместе с видеоматериалами считаются наиболее эффективным способом наполнения учебно-методических комплексов и online курсов [6, 7], поскольку они реализуют новые возможности преподавания и находят широкое применение при обучении специалистов [8]. Интерактивная кейс-технология применяется для краткосрочного обучения на основе реальных или вымышленных ситуаций (от *англ.* «case» – случай) и направлена на формирование у специалистов новых навыков и умений. Введение кейс-метода в российское медицинское образование определено Федеральным государственным образовательным стандартом, который делает необходимым использование активных, интерактивных форм проведения занятий, а именно введения «компьютерных симуляций, деловых и ролевых игр, разбора конкретных ситуаций, психологических и иных тренингов, групповых дискуссий и др.» [9, 10]. Пилотные исследования применения кейс-

технологии в обучении свидетельствуют об их широких возможностях в оптимизации процесса высшего образования. Применение кейс-метода возможно при обучении, мониторинге, выполнении самостоятельной работы и контроле её результатов.

Преподаватель при реализации кейс-метода выступает в качестве лидера-ведущего или регулятора дискуссии обучающихся с помощью проблемных вопросов. Целью применения кейс-метода в ходе изучения дисциплины является закрепление знаний, полученных на лекционном курсе; отработка практических навыков в ходе семинарских и практических занятий; обучение групповому анализу проблем и принятию решений. Доказано, что кейс-технологии способствуют развитию практических, аналитических, коммуникативных, творческих, социальных навыков и самоанализа.

Наиболее часто кейс или видеоролик представляет собой описание деловой ситуации в определённом формате. Он включает разные виды информации, её обобщения и возможные варианты решения поставленной проблемной задачи. Кейс обычно сопровождается 5–7 вопросами и методической запиской. Вопросы, завершающие кейс, направлены на то, чтобы помочь понять его основное содержание, сформулировать проблему, соотнести её с соответствующим этапом повышения квалификации. Методическая записка к кейсу содержит дополнительную информацию по ситуации или описание реального события. Видео-кейс, представляемый после учебного лекционного материала, содержит этапы организации и выполнения исследований в клинко-диагностических лабораториях. По результатам работы с кейсом слушатели должны подготовить план действий,



Тенденция развития дистанционного образования.

Приведено из <https://businessstat.ru> «Анализ рынка профессионального онлайн-образования в России в 2015–2019 гг., прогноз на 2020–2024 гг.».

позволяющих внести изменения в работу клиничко-диагностической лаборатории.

При работе с материалами, представленными в кейсе, важным является не только формальное использование инструментов интерактивных обучающих систем, но и оптимальное решение клиничко-лабораторных проблем. Введение кейс-метода меняет роль преподавателя в системе дистанционного обучения [10]. Процесс образования в системе постдипломного обучения становится более эффективным, если обучающийся совместно с другими переходит на позицию исследователя и готовит собственные видео-кейсы. При необходимости освоения дополнительных программ по специальности можно с самого начала обучения предоставить курсантам возможность объединиться в добровольные группы для содействия внедрению в клиническую практику инновационных лабораторных технологий. Завершающим этапом обучения на специальных курсах может быть разработка самими обучающимися видео-кейсов с нештатными, сложными ситуациями, требующими длительного времени и нестандартных подходов для разрешения.

Можно выделить 3 основных типа видео-роликов:

- ролики для использования на вводных лекциях, открывающие перспективы применения современных лабораторных технологий в практическом здравоохранении;
- ролики технологического характера для демонстрации техники выполнения лабораторных исследований с применением современных анализаторов и организации лабораторного процесса;
- ролики, заполняющие контекст лекций, со строго определенным объемом информации и продолжительностью не более 6-7 минут.

Ключевым аспектом при внедрении видео-кейсов в учебный процесс является корректная подготовка видеоматериалов. Основными этапами работы перед использованием видео-кейсов в учебном процессе служат: выявление важных общих моментов, связь учебного материала и видеофрагмента; обращение к видео, остановка демонстрации при необходимости дополнительных пояснений; обсуждение видеоматериала после показа.

Использование подготовленных по таким технологиям видео-кейсов в процессе обучения специалистов клинической лабораторной диагностики при проведении циклов переподготовки и повышения квалификации на кафедре клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России явилось удобным форматом обучения и получило положительную оценку курсантов. В частности, основная информация по лабораторным исследованиям методом ПЦР представлена в серии коротких обучающих видеороликов. Целью видеосериала стало получение обучающимися знаний (теоретического материала) и умений (его практической реализации). В первую часть сериала вошла лекция «Основы Real-time ПЦР» и три видео-кейса: «Взятие биоматериала для анализа респираторных инфекций методом Real-time ПЦР»; «Организация рабочего места для ручной методики выделения нуклеиновых кислот»; «Выделение нуклеиновых кислот. Метод сорбции». С учётом того, что оценка иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 остается одним из ключевых вопросов диагностики COVID-19,

продолжением сериала стали ролики: «Основы ИФА», «Особенности ИФА-диагностики COVID-19», «Качественное определение антител к SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа», «Количественное определение антител к SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа». В видеороликах представлены особенности иммунного ответа организма и роль серологических методов в диагностике инфекции COVID-19, особенности лабораторной диагностики внебольничной, в том числе, атипичной пневмонии как осложнения COVID-19, особенности выполнения и интерпретации результатов иммуноферментного анализа в комплексе диагностических мероприятий, подробные инструкции для качественного и количественного определения антител – иммуноглобулинов класса IgG к SARS-CoV-2.

Готовится раздел веб-сайта «IVD галерея», открывающий доступ к актуальным профессиональным знаниям в лабораторной медицине для широкого круга специалистов лабораторной службы (врачей и др.). Запланировано размещение на данном сайте библиотеки учебных видео-кейсов как дополнительного образовательного ресурса. Платформа поэтапно будет заполняться виртуальными сериалами и модулями, что позволит посетителям сайта получать сведения о наиболее современных и актуальных лабораторных технологиях для решения клинических задач. Использование видеоматериалов позволит существенно облегчить и ускорить получение новой информации при освоении учебных программ широкому кругу специалистов клинической лабораторной диагностики. Преподаватели смогут использовать данный виртуальный ресурс для дополнения, актуализации и, в целом, повышения качества образовательного процесса.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 10 см. REFERENCES)

1. Годков М. А., Долгов В. В., Ройтман А. П., Бугров А. В., Кисилевичина Д.Г. Профессиональная подготовка специалистов лабораторной службы по диагностике коронавирусной инфекции в удаленном формате. *Педагогика профессионального медицинского образования*. 2021;4:65-77.
2. Годков М.А., Долгов В.В., Вавилова Т.В., Иванов А.М., Элькин Г.И., Гильманов А.Ж., Цвиренко С.В., Базарный В.В., Соснин Д.Ю. Проблемы и возможные пути их решения при различных способах чтения лекционного курса в современных эпидемиологических условиях на примере дисциплины «Клиническая лабораторная диагностика». *Современные проблемы науки и образования*. 2022; 2: 158. DOI:10.17513/spno.31683.
3. Анализ рынка профессионального онлайн-образования в России в 2015-2019 гг., прогноз на 2020-2024 гг. – URL: https://businessstat.ru/images/demo/professional_online_learning_russia_demo_businessstat.pdf (дата обращения: 14.11.2021).
5. Неверова Л.В., Плотникова Е.С. Использование технологии видеокейсов в системе постдипломного образования. *Молодой ученый*. 2017;138(4):376-8.
6. Лебедева М.Б., Семенова Т.В. Образовательные кейсы как основа для реализации дистанционных образовательных технологий в системе повышения квалификации педагогов. *Научное обеспечение системы повышения квалификации кадров*. 2012;12(3):47-53.
7. Неверова Л.В., Плотникова Е.С. Использование технологии видеокейсов в системе постдипломного образования. *Молодой ученый*. 2017;138(4):376-8.
8. Сажнева С.В., Кузьменко Е.О. Кейс-метод как современная технология профессионально-ориентированного обучения студентов. URL : <http://www.be5.biz/ekonomika1/r2012/1907.htm>.

9. Путинцев А.Н., Алексеев Т.В. Кейс-метод в медицинском образовании: современные программные продукты. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;12: 1655-9; URL:https://applied-research.ru/article/view?id=11141.

REFERENCES

1. Godkov M.A., Dolgov V.V., Roitman A.P., Bugrov A.V., Kisilichina D.G Interactive professional training of specialists of the clinical laboratory service in the diagnosis of SARS-CoV-2. *Pedagogika professional'nogo meditsinskogo obrazovaniya*. 2021;4: 65-77. (in Russian)
2. Godkov M.A., Dolgov V.V., Vavilova T.V., Ivanov A.M., Elkin G.I., Gil'manov A.Z., Tsvirenko S.V., Bazarnyi V.V., Sosnin D.Yu. Problems and possible ways to solve them when in various ways of reading reading a lecture course in modern epidemiological conditions on the example of the discipline «Clinical laboratory diagnostics». *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2022; 2: 158. DOI:10.17513/spno.31683. (in Russian)
3. Analysis of the professional online education market in Russia in 2015-2019, forecast for 2020-2024. URL: https://businessstat.ru/images/demo/professional_online_learning_russia_demo_businessstat.pdf (дата обращения: 14.11.2021). (in Russian)
4. Brame C.J. Effective educational videos. Retrieved [today's date].2015. <http://cft.vanderbilt.edu/guides-sub-pages/effective-educational-videos/>.
5. Neverova L.V., Plotnikova E.S. The use of video space technology in the system of postgraduate education. *Molodoy uchoynyi*.2017;138(4):376-8. (in Russian)
6. Lebedeva M.B., Semenova T.V. Educational cases as a basis for the implementation of distance learning technologies in the system of professional development of teachers. *Nauchnoe obespechenie sistemy povysheniya kvalifikatsii kadrov*. 2012; 12(3): 47-53. (in Russian)
7. Neverova L.V., Plotnikova E.S. The use of video space technology in the system of postgraduate education. *Molodoy uchyonyi*. 2017; 138(4):376-8. (in Russian)
8. Sazhneva S.V., Kuzmenko E.O. Case method as a modern technology of professionally-oriented training of students. URL: <http://www.be5.biz/ekonomika1/r2012/1907.htm>. (in Russian)
9. Putintsev A.N., Alekseev T.V. Case based learning in medical education: modern software products. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016; 12: 1655-9. (in Russian)
10. Learning Apps – interactive learning modules. URL: http://learnin-gapps.org/user/psi_log.