

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес:

ООО «Издательская группа «Медиа
Сфера»

115088, Москва, 127238, г. Москва,
Дмитровское ш, д. 46 к. 2 стр. 2, этаж 4
ком. 12

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 03.03.2023.

Подписано в печать 20.03.2023.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 7,00

Уч.-изд. л. 8,95.

WWW страница: www.medlit.ru

ПИ № ФС77-37760 от 07. 10. 2009 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память
компьютера либо воспроизведена любым
способом без предварительного письменного
разрешения 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, EMBASE 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.wakc.ru, www.pressa-ef.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084.

Клин. лаб. диагностика. 2023. № 1. 1–64.

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:

И.И. АНДРЕЕВА (*Ростов-на-Дону*), А.Н. АРИПОВ
(*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*),
I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМА-
НОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК
(*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*),
Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*),
А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Сток-
гольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*),
К.П. КАШКИН (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*),
Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*),
А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Мо-
сква*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), 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 (*Алма-
ты*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ
(*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРО-
ВАЯ (*Москва*)

The Journal is founded in 1955.

Mailing address :

LLC "Publishing Group "Media Sphere"
127238, Moscow, Dmitrovskoe sh., 46 k. 2
building 2, floor 4 rooms. 12

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*

WWW page: www.medlit.ru

PI No. FS77-37760 of 07.10. 2009

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
Miology, Adis International Ltd Reactions
Weekly, Chemi-cal 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:

I.I.Andreeva (*Rostov-on-Don*), 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. EL-
CHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), A. KALLNER
(*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peter-
burg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peter-
burg*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*),
A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Mos-
cow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), V.N. MALACHOV (*Moscow*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Mos-
cow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA
(*Moscow*)

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

*Петелина Т.И., Авдеева К.С., Валеева Л.Л., Ляпина М.В., Щербинина А.Е., Мусихина Н.А.,
Леонович С.В., Капустина А.А., Гапон Л.И.*

Особенности и взаимосвязь параметров метаболома микробиоты кишечника
с биомаркерами крови и структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки
у пациентов с артериальной гипертонией. 189

*Любимова Н.В., Лебедева А.В., Тимофеев Ю.С., Вашкетова О.И., Карамышева Е.И.,
Делекторская В.В., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е.*

Факторы роста CTGF и TGF- β 1 в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями 199

Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г.

Неоптерин в качестве кардиоваскулярного биологического маркера
при сердечной недостаточности (обзор литературы) 203

ИММУНОЛОГИЯ

*Амхадова М.А., Петрухина Н.Б., Сандлер И.В., Салтовец М.В., Поляков В.М., Демидова А.А.,
Пилипенко К.Д.*

Особенности цитокинового состава и костного метаболизма биологических сред полости рта
у пациентов с пародонтитом после коронавирусной инфекции. 210

ЦИТОЛОГИЯ

Крысалова Т.И., Калаева Е.А., Калаев В.Н., Игнатова И.В.

Влияние способа окрашивания на результаты цитологического исследования
эпителия шейки матки 215

МИКРОБИОЛОГИЯ

Никольский М.А., Ведерников В.Е., Вязовая А.А., Домонова Э.А., Лисок А.В., Лиознов Д.А.

Апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов
для видовой дифференциации вирусов герпеса человека 6А и 6В 224

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

Клиническая значимость доминирующих родов резидентного микробиома опухолей почки 232

Чеснокова М. Г., Чесноков С. А., Миронов А. Ю.

Микобиота зубной бляшки у детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении . . . 237

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Марданлы С.Г., Жигалева О.Н.

Анализ требований к промышленному производству ПЦР-диагностикумов 243

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ И ЧИТАТЕЛЕЙ!

Подписка на электронную версию журнала
«КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА»
осуществляется через ELIBRARY.RU

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Petelina T.I., Avdeeva K.S., Valeeva L.L., Lyapina M.V., Shcherbinina A.E., Musikhina N.A., Leonovich S.V., Kapustina A.A., Gapon L.I.*
Peculiarities and interrelation of intestinal microbiota metabolome parameters with the biomarkers and the structural and functional state of the vascular wall in patients with arterial hypertension. 189
- Lyubimova N.V., Lebedeva A.L., Timofeev Yu.S., Vashketova O.I., Karamysheva E.I., Delectorskaya V.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E.*
Growth factors CTGF and TGF- β 1 in the blood serum of neuroendocrine tumor patients 199
- Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G.*
Neopterin as a cardiovascular biological marker in heart failure (review of literature). 203

IMMUNOLOGY

- Amhadova M.A., Petrukhhina N.B., Sandler I.V., Saltovets M.V., Polyakov V.M., Demidova A.A. Pilipenko K.D.*
Features of the cytokine composition and bone metabolism of the biological media of the oral cavity in patients with periodontitis after coronavirus infection 210

CYTOLOGY

- Krysalova T.I., Kalaeva E.A., Kalaev V.N., Ignatova I.V.*
The influence of the method of staining on the results of cytological study of the cervical epithelium 215

MICROBIOLOGY

- Nikolskiy M.A., Vedernikov V.E., Vyazovaya A.A., Domonova E.A., Lisok A.V., Lioznov D.A.*
Approbation and preclinical trials of Russian reagents set for species differentiation of human herpes viruses 6A and 6B 224
- Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N.*
Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome 232
- Chesnokova M.G., Chesnokov S.A., Mironov A.Yu.*
Mycobiota of dental plaque in children with dental anomalies during orthodontic treatment 237

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

- Mardanly S.G., Zhigaleva O.N.*
Analysis of requirements for industrial production of PCR diagnostics 243

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Петелина Т.И.¹, Авдеева К.С.¹, Валеева Л.Л.¹, Ляпина М.В.², Щербинина А.Е.¹, Мусихина Н.А.¹,
Леонович С.В.¹, Капустина А.А.^{1,2}, Гапон Л.И.¹

ОСОБЕННОСТИ И ВЗАИМОСВЯЗЬ ПАРАМЕТРОВ МЕТАБОЛОМА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА С БИОМАРКЕРАМИ КРОВИ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ

¹Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 634031, Томск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 625023, Тюмень, Россия

Несмотря на хорошо известные факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), сохраняется актуальность поиска новых механизмов развития и прогрессирования ассоциированных с атеросклерозом заболеваний. Значительный интерес в последнее время сосредоточен на изучении роли параметров метаболома микробиоты кишечника (МК) как модифицируемого фактора риска нарушений обмена веществ и развития ССЗ. Целью работы стало исследование особенностей параметров метаболома МК в ассоциации с воспалительными, биохимическими, гормональными параметрами и структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертонией (АГ). Перед включением в исследование у каждого из участников было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании. Обследован 141 пациент с АГ. Пациенты разделены на 3 группы. В 1-й группе 34 пациента без АГ и метаболических нарушений (37,67±13,95 года), во 2-й группе 49 пациентов с АГ без абдоминального ожирения (АО) (51,69±12,70 года), в 3-й группе 58 пациентов с АГ и АО (47,79±10,61 года). Пациенты 1-й группы значимо отличались по всем параметрам от 2-й и 3-й групп ($p < 0,001$). Пациенты 2-й группы значимо отличались от 3-й группы по параметрам массы тела, которые были значимо выше в группе АГ с АО. Пациентам в обеих исследуемых группах проводилось лабораторное исследование биообразца крови и кала в момент госпитализации. Оценивали параметры метаболома МК: уровень триметиламин-N-оксида (ТМАО), короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) в копрофильtrate, уровень FABP2-белка (интестинальный FABP); из биохимических параметров определяли мочевую кислоту, печеночные ферменты, липидный профиль, глюкозу натощак; воспалительные маркеры – исследовали концентрацию С-реактивного белка (вч-СРБ), уровень интерлейкина (ИЛ) – 1 β , 6, 8, 10, гомоцистеина; гормоны – адипонектин, резистин, лептин. В обеих исследуемых группах проводилось суточное мониторирование артериального давления (СМАД) по стандартному протоколу; исследование эластических свойств сосудистой стенки проводили методом сфигмографии на аппарате Vasera VS-1000 Series (Fukuda Denishi, Япония), с оценкой показателей: PWV-R PWV-L – скорость распространения пульсовой волны (СПВР) и САVI R/L-параметр жесткости сосудистой стенки по артериям эластического типа справа и слева. Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 21.

Результаты полученных исследований показали тенденцию к превышению значений ТМАО, ТМАО и значимое превышение уровня FABP2 ($p < 0,043$), со снижением уровня КЦЖК ($p < 0,001$) во 2-й группе по сравнению с 1-й группой пациентов. Зарегистрированы значимо высокие уровни ИЛ-1 β , ИЛ-6, вч-СРБ, гомоцистеина во 2-й и 3-й группах по сравнению с 1-й группой. У пациентов 3-й группы выявлены значимо высокие значения уровня ИЛ-1 β , вч-СРБ по сравнению со 2-й группой ($p < 0,043$; $0,005$, соответственно). Во 2-й и 3-й группах отмечалось значимое превышение показателей липидного обмена по сравнению с 1-й группой. В 3-й группе выявлено самое низкое содержание адипонектина ($p = 0,002$). Параметры СМАД достоверно выше в группах с наличием АГ по сравнению с 1-й группой. Зарегистрировано, что показатели САVI и PWV значимо выше у пациентов 2-й и 3-й групп ($p < 0,001$), с более высокими значениями во 2-й группе пациентов. Выявлены многочисленные разнонаправленные корреляционные взаимосвязи между параметрами метаболитов микробиоты кишечника с изучаемыми биомаркерами крови и инструментальными параметрами исследования. Таким образом, выявлены измененные уровни параметров метаболома МК – ТМАО, КЦЖК, FABP2 в группах пациентов с АГ по сравнению с группой контроля. Разнонаправленные корреляционные ассоциации параметров метаболома МК с биомаркерами, параметрами СМАД и эластическими свойствами сосудистой стенки позволяют подтвердить роль МК как фактора, влияющего на патогенетические звенья развития и прогрессирования артериальной гипертонии.

Ключевые слова: метаболиты микробиоты кишечника; артериальная гипертония; жесткость сосудистой стенки.

Для цитирования: Петелина Т.И., Авдеева К.С., Валеева Л.Л., Ляпина М.В., Щербинина А.Е., Мусихина Н.А., Леонович С.В., Капустина А.А., Гапон Л.И. Особенности и взаимосвязь параметров метаболома микробиоты кишечника с биомаркерами крови и структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертонией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 189-198. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-189-198>

Для корреспонденции: Петелина Татьяна Ивановна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния артериальной гипертонии и коронарной недостаточности научного отдела клинической кардиологии; e-mail: petelina@infarkta.net

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.02.2023

Принята к печати 24.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

Petelina T.I.¹, Avdeeva K.S.¹, Valeeva L.L.¹, Lyapina M.V.², Shcherbinina A.E.¹, Musikhina N.A.¹, Leonovich S.V.¹, Kapustina A.A.^{1,2}, Gapon L.I.¹

PECULIARITIES AND INTERRELATION OF INTESTINAL MICROBIOTA METABOLOME PARAMETERS WITH THE BIOMARKERS AND THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE VASCULAR WALL IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

¹Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia;

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tyumen State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation

Despite the well-known risk factors for cardiovascular diseases (CVD), the search for new mechanisms for the development and progression of atherosclerosis-associated diseases remains relevant. Considerable interest has recently been focused on studying the role of intestinal microbiota (IM) metabolome parameters as a modifiable risk factor for metabolic disorders and the development of CVD. To study the peculiarities of IM metabolome parameters in association with inflammatory, biochemical, hormonal parameters and the structural and functional state of the vascular wall in patients with arterial hypertension (AH). 141 patients with AH were divided into 3 groups: 34 patients without AH and metabolic disorders (37.67±13.95 years) were included in group 1 (control group), 49 patients with AH without abdominal obesity (AO) (51.69±12.70 years) – in group 2 and 58 patients with AH and AO (47.79±10.61 years) – in group 3. Patients in group 1 differed significantly in all parameters from groups 2 and 3 ($p<0.001$). Patients in group 2 differed significantly from group 3 in terms of body mass index (BMI), waist-hip ratio, which were significantly higher in AH group with AO. Patients in both study groups underwent a laboratory study of blood and stool bio-samples at the time of hospitalization. IM metabolome parameters were assessed: the level of trimethylamine-N-oxide (TMAO), short-chain fatty acids (SCFA) in coprofiltrate, the level of intestinal FABP (FABP2); from biochemical parameters: uric acid, creatinine, liver enzymes, lipid profile, fasting glucose; hormones – adiponectin, resistin, ghrelin, leptin; inflammatory markers – concentration of C-reactive protein (hs-CRP), interleukin (IL) 1 β , 6, 8, 10, homocysteine were determined. In both study groups there were performed: 24-hour ambulatory blood pressure (BP) monitoring (ABPM); study of the elastic properties of the vascular wall by sphygmography on Vasera VS-1000 Series device, with the assessment of the following parameters: pulse wave velocity in the arteries of elastic type on the right and left (PWV-R/L); stiffness of the vascular wall in the arteries of the elastic type on the right and left (CAVI R/L). The results of statistical analysis showed a tendency for TMAO, TMA values to be higher and FABP2 level to be significantly higher ($p<0.043$), and for the level of SCFA ($p<0.001$) to be lower in group 2 compared to group 1 patients. Significantly high values of parameters IL-1 β , IL-6, hs-CRP, homocysteine were registered in groups 2 and 3 in comparison with the control group. Patients with AH and AO showed significantly higher levels of IL-1 β , hs-CRP compared to AH group without obesity ($p<0.043$; 0.005, respectively). In groups 2 and 3, there is a significant excess of lipid metabolism, indicators of liver function in comparison with group 1. In AH group with AO, the lowest content of adiponectin ($p=0.002$), resistin and ghrelin ($p=0.029$) was revealed, at the same time, they had a significantly higher level of glucose and lipid spectrum indicators, hepatic transaminases ($p<0.001$), in comparison with control group. ABPM parameters were significantly higher in groups with AH than in the control group. It was registered that CAVI and PWV rates were significantly higher in patients of groups 2 and 3 ($p<0.001$), with higher values in group 2. Numerous multidirectional correlations have been revealed between the parameters of IM metabolome and biochemical, inflammatory, hormonal and instrumental parameters of the study. Thus, the study revealed elevated levels of IM metabolome parameters – TMAO, SCFA, FABP2 in AH patient compared with the control group. Multidirectional correlations of IM metabolome parameters with biochemical, non-specific immune and hormonal biomarkers, ABPM parameters and elastic properties of the vascular wall confirm the role of IM as a factor influencing pathogenetic links in the development and progression of AH.

Key words: intestinal microbiota metabolome; arterial hypertension; vascular wall stiffness.

For citation: Petelina T.I., Avdeeva K.S., Valeeva L.L., Lyapina M.V., Shcherbinina A.E., Musikhina N.A., Leonovich S.V., Kapustina A.A., Gapon L.I. Peculiarities and interrelation of intestinal microbiota metabolome parameters with the biomarkers and the structural and functional state of the vascular wall in patients with arterial hypertension. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 189-198. (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-189-198

For correspondence: Petelina Tatiana Ivanovna, MD, Leading Researcher of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency of the Scientific Department of Clinical Cardiology; e-mail: petelina@infarkta.net

Information about authors:

Petelina T.I., <https://orcid.org/0000-0001-6251-4179>;
Avdeeva K.S., <https://orcid.org/0000-0002-2134-4107>;
Valeeva L.L., <https://orcid.org/0000-0002-0627-1907>;
Lyapina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9608-2746>;
Shcherbinina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2056-2217>;
Musikhina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-8280-2028>;
Leonovich S.V., <https://orcid.org/0000-0002-8562-6955>;
Kapustina A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0587-0991>;
Gapon L.I., <https://orcid.org/0000-0002-3620-0659>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 08.02.2023
Accepted 24.02.2023
Published 00.04.2023

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной смерти и инвалидизации в развитых странах мира. В США каждый третий, в Европе – каждый четвертый житель умирает от ССЗ. В России смертность от ССЗ обуславливает каждый второй случай летальных исходов [1, 2]. Широко обсуждаются факторы риска развития ССЗ, ведущее место среди них занимают патологические состояния, ассоциированные с метаболическими нарушениями (ожирение, сахарный диабет, нарушения липидного обмена). Вместе с тем, сохраняет актуальность поиск новых механизмов развития и прогрессирования ССЗ [2]. Значительный интерес в последнее время сосредоточен на изучении роли микробиоты кишечника (МК) как фактора риска различных нарушений обмена веществ и развития ССЗ [3]. В физиологических условиях микробиота желудочно-кишечного тракта способствует усвоению основных питательных веществ, выполняет важную барьерную функцию, подавляя чрезмерный рост и колонизацию потенциально патогенных бактерий, синтезирует витамин К и биотин. При патологических состояниях микробиота кишечника способна выступать в качестве самостоятельного фактора, определяющего неблагоприятный прогноз заболевания, влиять на метаболизм лекарственных препаратов и способствовать выработке фармакологически активных вторичных метаболитов, способных вызывать побочные эффекты [4].

Изменения разнообразия и состава микробиоты кишечника связаны с патофизиологией большинства хронических заболеваний. В настоящее время накапливаются научные данные по влиянию МК на развитие и прогрессирование артериальной гипертензии,

сердечной недостаточности и ряда других ССЗ [5]. Было выявлено несколько механизмов, связывающих дисбиоз с дисметаболическими состояниями, такими как аномальная кишечная проницаемость, повышенная абсорбция липолисахаридов (ЛПС), абберантное превращение первичных желчных кислот во вторичные, повышенная продукция бактериальных токсических соединений, таких как триметиламин-N-оксид (ТМАО), аномальная продукция короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [6]. Эти аномалии приводят к активации воспалительных и аутоиммунных путей, нарушению липидного обмена и прогрессированию атеросклероза. Связь состояния кишечника с артериальным давлением (АД), структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки и развитием АГ находит подтверждение в ряде экспериментальных и клинических работ [7] и является актуальной темой для продолжения научного поиска.

Цель работы – исследовать особенности параметров метаболома МК в ассоциации с воспалительными, биохимическими, гормональными биомаркерами и со структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки у пациентов с АГ.

Материал и методы. Исследование проспективное, соответствующее стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и положениям Хельсинской Декларации. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра РАН (протокол № 159 от 23.07.2020 г.). Перед включением в исследование у каждого из участников было получено письменное информированное согласие на участие в исследова-

Таблица 1

Клинико-anamnestические данные пациентов, включенных в исследование

Показатели	Группа контроля (n=34)	p 1 и 2	2-я группа с АГ (n=49)	p 2 и 3	3-я группа с АГ и АО (n=58)	p 1 и 3
Возраст, годы	37,67±13,95	<0,001	51,69±12,70		47,79±10,61	<0,001
Масса тела, кг	60,48±6,92	<0,001	70,89±12,47	<0,001	101,84±18,16	<0,001
Индекс массы тела, кг/м ²	22,13±2,32	<0,001	25,63±3,11	<0,001	35,41±4,97	<0,001
Объем талии, см	74,42±8,18	<0,001	84,99±11,21	<0,001	109,74±13,67	<0,001
Объем бедер, см	74,00±41,88	<0,001	101,69±9,92	<0,001	114,97±12,19	<0,001
От/Об	0,77±0,08	<0,001	0,84±0,09	<0,001	0,94±0,06	<0,001
Степень ожирения:						
1					34 (58,6%)	
2					16 (27,6%)	
3					8 (13,8%)	
Степень АГ:						
1			16 (33%)		17 (29,31%)	
2			18 (37%)		22 (37,93%)	
3			15 (30%)		19 (32,76%)	
Пол: Мужчины/Женщины	1/33		12/37		24/34	

Примечание. p – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й, 2-й и 3-й, 3-й и 1-й группами.

нии и об использовании результатов обследования в научных целях.

В исследование были включены 141 пациент с артериальной гипертонией (АГ). Клинико-anamnestические данные представлены в табл. 1.

Все пациенты были разделены на 3 группы. В 1-ю группу вошли 34 пациента без АГ и метаболических нарушений, группа контроля. Во 2-ю группу вошли 49 пациентов с АГ без абдоминального ожирения (АО), 3-ю группу составили 58 пациентов с АГ и АО. Пациенты 1-й группы значимо отличались по всем параметрам от 2-й и 3-й групп ($p < 0,001$). Пациенты 2-й группы отличались от 3-й группы по параметрам массы тела, ИМТ, объему талии и бедер, отношению объема талии/объем бедер, которые были значимо выше в 3-й группе. По выраженности степени гипертензии и гендерному составу 2-я и 3-я группы значимо не различались.

К моменту проведения исследования пациенты 2-й и 3-й групп принимали равнозначный процент препаратов из группы ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента или блокаторов ангиотензиновых рецепторов 65,43%, 66,8%, соответственно.

Пациентам в обеих исследуемых группах проводилось лабораторное исследование биообразца крови и кала в момент госпитализации. Оценивали параметры метаболома микробиоты кишечника (МК): уровень триметиламина (ТМА), ТМАО в образцах крови на базе биоаналитической лаборатории «Экзактэ Лабс» на жидкостном хромато-масс-спектрометре Shimadzu 8050 (Япония) с электрораспылительной ионизацией; короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) в копрофильtrate определяли методом ГХМС/ГХ-ПИД (газовой хроматографии-масс-спектрометрии / газовой хроматография с пламенно-ионизационным детектированием); особенности проницаемости кишечной стенки – FABP2-белок, связывающий жирные кислоты (интестинальный FABP) – белок эпителиальных клеток, ранний маркер повреждения тонкой кишки, исследовали методом иммуноферментного анализа при помощи коммерческих наборов Human I-FABP (Нидерланды) на автоматическом иммуноферментном анализаторе BioRad Sunrise (Япония). Из биохимических параметров определяли мочевую кислоту, печеночные ферменты, липидный профиль, глюкозу натощак на биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400» (Италия); гормональный статус – адипонектин, резистин, лептин (реактивы Diagnostics Biochem Canada Inc., Канада) и концентрацию С-реактивного белка (вч-СРБ, реактивы Вектор–Бест, Россия) – определяли иммуноферментным анализом на микропланшетном фотометре Stat Fax 4200 (США); уровень интерлейкина (ИЛ) – 1 β , 6, 8, 10, гомоцистеина методом твердофазного хемиллюминесцентного иммуноферментного анализа («сэндвич» метод) на анализаторе «IMMULITE 2000» (реактивы Siemens Diagnostics, США).

В обеих исследуемых группах проводили: точное мониторирование артериального давления (СМАД) на аппарате ВРLaВ (производитель ООО «Петр Телегин», Россия) по стандартному протоко-

лу; исследование эластических свойств сосудистой стенки методом сфигмографии на аппарате Vasera VS-1000 Series (Fukuda Denishi, Япония), с оценкой показателей: PWV-R PWV-L – скорость распространения пульсовой волны и CAVI R/L – параметр жесткости сосудистой стенки по артериям эластического типа справа и слева.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводился с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 21. В зависимости от распределения при сравнении показателей в 2-х независимых группах использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни. При нормальном распределении данные представляли, как среднее (M) и стандартное отклонение (SD), при распределении, отличном от нормального, данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%;75%]. Парным критерием Стьюдента или критерием Вилкоксона рассчитывали динамику между связанными группами. Использовали корреляционный анализ Спирмена. Результаты оценивались как статистически значимые при двухстороннем уровне $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе работы мы проанализировали показатели метаболома МК в исследуемых группах пациентов (табл. 2).

По данным табл. 2, показатели ТМАО, ТМА и соотношение ТМА к ТМАО достоверно не отличались между группами, однако максимальные значения показателей ТМА и ТМАО отмечались у пациентов с АГ во 2-й группе. FABP2-белок (I-FABP) – уровень параметра интестинального повреждения тонкой кишки зарегистрирован также значимо выше во 2-й группе пациентов.

По результатам исследования КЦЖК выявлено, что во 2-й и 3-й группах достоверно выше показатели абсолютного содержания монокарбоновых кислот: С2 – уксусной, С3 – пропионовой, С4 – масляной и их суммарного содержания по сравнению с 1-й группой пациентов. Анализ относительной концентрации представленных КЦЖК не выявил значимых изменений между группами.

Микробиота кишечника (МК) выполняет множество биологических функций и за последние два десятилетия накоплены доказательства влияния на развитие дислипидемии и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), как непосредственно населяющими ее организмами, так и при помощи различных метаболитов, таких, как ТМАО, жирные кислоты, желчные кислоты и копростанол [8,9]. Изменения состава и метаболизма МК могут выступать независимым фактором риска ССЗ, что подтверждается данными многих клинических исследований. Повышенное содержание ТМАО может способствовать активации воспаления и окислительного стресса, что существенно повышает риск развития больших сердечно-сосудистых событий. В клинических исследованиях высокий уровень ТМАО независимо ассоциировался с риском развития инфаркта миокарда, инсульта, смерти от ССЗ и реваскуляризации [9]. Обсуждается множество механизмов ускорения развития атеро-

Показатели метаболизма микробиоты кишечника в исследуемых группах пациентов

Показатели	Группа контроля, n=34	p 1 и 2	2-я группа с АГ, n=49	p 2 и 3	3-я группа с АГ и АО, n=58	p 1 и 3
ТМАО, мкмоль/л	11,52 [5,79;15,86]		19,3 [6,35;47,57]		12,05 [6,64;20,95]	
ТМА, мкмоль/л	0,25±0,10		0,37±0,21		0,28±0,16	
ТМА/ТМАО	0,02±0,01		0,02±0,01		0,03±0,03	
FAVR2-белок (I-FAVR), нг/мл	489,74±297,15		560,23±308,72	0,043	409,46±228,82	
КЦЖК-абсолютное содержание C2 (уксусная), мг/г	0,45 [0,37;0,70]	0,032	1,32 [0,49;1,87]		1,29 [0,52;2,22]	0,018
Абсолютное содержание C3 (пропионовая), мг/г	0,123 [0,09;0,185]	0,025	0,354 [0,122;0,62]		0,308 [0,135;0,66]	0,003
Абсолютное содержание C4 (масляная), мг/г	0,11 [0,06;0,21]	0,064	0,38 [0,11;0,60]		0,29 [0,12;0,60]	0,036
Суммарное содержание ИзоСп изоС4+изоС5+изоС6	0,11 [0,10;0,14]	0,040	0,09 [0,04;0,10]		0,07 [0,05;0,10]	0,009
ИзоСп/Сп, Ед	0,295±0,071		0,281±0,101	0,001	0,302±0,117	0,001
Суммарное содержание C2+C3+C4+C5+C6+изоС4+изоС5+изоС6	0,84 [0,68;1,16]	0,079	2,32 [0,82;3,31]		2,07 [0,88;3,70]	0,014
ИзоСп-изоС4-изоС5-изоС6	0,09 [0,05;0,11]	0,025	0,14 [0,09;0,37]		0,13 [0,08;0,18]	0,068
Относительное содержание C2 (уксусная), Ед	0,69±0,07	-	0,65±0,03	-	0,65±0,06	-
Относительное содержание C3 (пропионовая), Ед	0,17±0,04	-	0,18±0,02	-	0,19±0,05	-
Относительное содержание C4 (масляная), Ед	0,15±0,07	-	0,17±0,03	-	0,15±0,05	-
Анаэробный индекс (C2-C4), Ед	-0,47±0,16	-	-0,53±0,07	-	-0,54±0,15	-

Примечание. p – статистическая значимость различий между 1 и 2-й, 2-й и 3-й, и 3-й и 1-й группами.

FAVR2-белок – параметр интестинального повреждения тонкой кишки.

склероза при высоком уровне ТМАО, однако нужно отметить, что имеющиеся данные о влиянии ТМАО на организм человека достаточно противоречивы. С одной стороны, по литературным данным, повышенный уровень ТМАО ассоциируется с увеличением риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий и смерти от любых причин. С другой стороны, по данным M.E. Dumas и соавт. [10], концентрация ТМАО в моче японцев значительно больше, чем у жителей США. Тем не менее, продолжительность жизни выше в Японии, тогда как смертность от возраст-ассоциированных заболеваний выше в США.

Кроме этого, микробиота кишечника метаболизирует сложные углеводы с образованием короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), которые принимают участие в передаче сигналов другим представителям экосистемы кишечника, энергетическом обмене, поддержании уровня pH, оптимального для существования микробиоты. КЦЖС обладают гипополипидемическим действием благодаря способности блокировать синтез холестерина в печени [9,11].

FAVR2-белок (I-FAVR) – параметр интестинального повреждения тонкой кишки и индикатор синдрома повышенной проницаемости эпителия и эндотелия. Имеющиеся литературные данные кон-

статируют, что повышенная проницаемость обеспечивает быстрый ответ эндотелия на повреждение развитием локального воспаления. Поскольку при воспалении проницаемость эндотелия повышается, это приводит к попаданию антигенов в кровь и, провоцируя иммунные реакции, имеющие системный характер, приводит к выбросу различных цитокинов, вплоть до развития «цитокинового шторма», и формирования синдрома системной воспалительной реакции (SIRS). Гиперцитокинемия, в свою очередь, вызывает дальнейшее повышение проницаемости эндотелия и его дисфункцию, что, в сочетании с ДВС-синдромом, может привести к развитию полиорганной недостаточности. Таким образом, в результате определенных изменений состава МК и ее метаболизма активируются процессы системного воспаления, которые могут приводить к росту патогенных бактерий, обладающих провоспалительным действием, что усиливает локальный иммунный ответ. Это сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов и адипокинов – фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α), интерлейкина-6 (IL-6), лептина [9,12].

Результаты параметров воспалительных маркеров приведены в табл. 3.

Параметры биомаркеров воспалительной реакции в исследуемых группах пациентов

Показатели, ед/измерения, нормативные значения	Группа контроля, n=34	p 1 и 2	2-я группа с АГ, n=49	p 2 и 3	3-я группа с АГ и АО, n=58	p 1 и 3
СРБ, мг/л 0-5	1,93 [1,19;2,44]		1,33 [0,52;2,60]	0,011	2,44 [1,00;5,83]	
TNF-α, пг/мл 0-6	4,10 [3,23;4,70]		4,00 [2,82;4,66]		3,70 [2,40;4,80]	
IL-1β, пг/мл 0-5	5,76±3,26		6,94±3,54	0,043	7,97±2,91	<0,001
IL-6, пг/мл 0-4,1	1,81 [1,76;2,03]	<0,05	2,00 [1,91;2,11]	0,046	2,08 [1,95;2,75]	<0,001
IL-8, пг/мл 0-62	4,57±0,42		4,69±0,39		4,51±0,89	
вч-СРБ, мг/л 0-5	0,87 [0,46;1,91]	<0,004	1,94 [1,33;5,54]	0,005	4,39 [1,33;10,00]	<0,003
GDF15, пг/мл 200-653	322,20±101,88	<0,003	430,19±132,09		386,10±123,55	
НСУ, мкмоль/л 5-15	10,10 [8,63;13,70]	<0,05	11,20 [9,32;16,45]		12,50 [10,25;17,35]	<0,021

Примечание. p – статистическая значимость различий между 1 и 2-й, 2-й и 3-й, и 3-й и 1-й группами.

вч-СРБ - высокочувствительный С-реактивный белок; TNF-α- фактор некроза опухоли; IL- интерлейкины; GDF- фактор дифференцировки роста -15; НСУ – гомоцистеин.

Согласно результатам табл. 3, зарегистрированы значимо более высокие показатели значений параметров СРБ, ИЛ-1β, ИЛ-6, вч-СРБ, гомоцистеина во 2-й и 3-й группах по сравнению с контрольной группой. У пациентов 3-й группы выявлены статистически значимо превышающие значения во 2-й группе уровни ИЛ-1β и вч-СРБ. Повышение уровня воспалительных маркеров в группах с АГ являются фактором, обуславливающим прогрессирование сосудистого воспалительного процесса с возможным поражением органов-мишеней.

Анализ проведенного биохимического исследования показал значимое превышение уровня мочевой кислоты (242,67±87,57; 308,46±89,08; 308,46±89,08 мкмоль/л, p<0,001- данные соответственно группам пациентов) и АЛТ (18,60±6,63; 24,72±12,16; 33,60±18,51 ед/л, p<0,001) в 3-й группе пациентов по сравнению с 1-й и 2-й группами. Превышение уровня ОХС (4,76±0,87; 5,61±1,32; 5,58±1,31 ммоль/л, p<0,001), ХСЛПНП (2,58±0,83; 3,44±0,92; 3,38±1,12 ммоль/л, p<0,001) во 2-й и 3-й группах по сравнению с 1-й группой. Максимальный, превышающий референсные значения уровень ТГ (1,99±1,57 ммоль/л), был зарегистрирован в 3-й группе пациентов.

Большое значение на выраженность метаболических изменений в организме играют гормоны жировой ткани, такие как адипонектин, резистин, лептин. Было выявлено, что у пациентов 3-й группы отмечено самое низкое содержание адипонектина ([3929,50 [3330,75;4524,25]; 4424,50 [3852,50;4607,50]; 3860,00 [3365,13;4261,50] мг/мл, p=0,002) при значимо более высоком уровне глюкозы и гликированного гемоглобина (5,59±1,00 ммоль/л, 5,86±0,49%, p<0,001) у пациентов АГ с абдоминальным ожирением по сравнению

с контрольной группой. Результаты исследования согласуются с литературными данными, которые свидетельствуют о том, что в норме адипонектин увеличивает окисление жира на периферии, снижает уровень свободных жирных кислот в крови, уменьшая содержание внутриклеточных триглицеридов в печени и мышцах; кроме того, под его влиянием наблюдается снижение уровня глюкозы в крови без увеличения секреции инсулина. Уровень адипонектина коррелирует с чувствительностью тканей к инсулину, т. е. гипoadипонектинемия может приводить к инсулинорезистентности (ИР) и сахарному диабету (СД). Адипонектин обладает противовоспалительными и антиатерогенными эффектами [13].

Уровень резистина в 3-й группе был несколько выше значений в других группах (1200,50 [8,63;1634,25]; 916,00 [565,50;1122,00]; 1246,17 [673,25;1292,38] нг/мл), но без значимой разницы. Известно, что это один из возможных индикаторов метаболических нарушений, стимулируемый жировой тканью. Именно этот адипокин ответственен за развитие инсулинорезистентности (ИР). Уровень резистина повышается в группах с максимальной степенью ожирения. В нашем исследовании в 3-й группе большинство пациентов имели 1 и 2-ю степени ожирения. Выявлено, что резистин продуцируется не только адипоцитами, но и моноцитами, макрофагами и кардиомиоцитами. В настоящее время доказана его роль в инициации воспалительных реакций, активации эндотелина, пролиферации гладкомышечной мускулатуры сосудистой стенки и ее ремоделирования, в связи с чем, резистин стал маркером сердечно-сосудистых заболеваний. Резистин ухудшает функцию эндотелия посредством снижения экспрессии эндотелиальной

НО-синтетазы, уровня оксида азота и увеличивает экспрессию VCAM-1 и MCP-1, участвующих в формировании атеросклеротического поражения. Кроме этого, были получены данные о прямом воздействии резистина на экспрессию ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α , что в совокупности ассоциируется с развитием инсулинорезистентности и неспецифического воспаления с развитием серьезных кардиоваскулярных событий [14]. В ряде работ были получены достоверные данные о взаимосвязи артериального давления с высоким уровнем резистина у больных с АГ [15].

Лептин является пептидным гормоном, вырабатывается в клетках жировой ткани, регулирует энергетический обмен и массу тела. Известно, что на фоне выраженного ожирения может провоцировать развитие воспалительных процессов и инициировать развитие ССЗ [13]. В нашем исследовании уровень лептина не превышал референсные значения во всех группах (3,7-11,1 нг/мл).

В последнее десятилетие привлечено внимание специалистов по артериальной гипертонии к изучению процессов ремоделирования сосудов эластического типа и его клинической значимости. Убедительно доказано, что при длительном воздействии факторов общего сердечно-сосудистого риска – возраст, АГ, дислипидемия, гипергликемия и других, в артериальной сосудистой системе прогрессируют атеросклеротические, инфильтративные и дегенеративные изменения, нарастает дисфункция эндотелия [15,16]. Особое значение среди цитокинов в цепи развития

АГ с ожирением имеет секреторная форма интерлейкинов, в частности, ИЛ-6. Повышение уровня ИЛ-6, ИЛ-8, СРБ вызывает множество изменений на клеточном уровне, тем самым способствуя усугублению эндотелиальной дисфункции и прогрессированию АГ. В табл. 4 представлены показатели суточного мониторинга АД и эластических свойств сосудистой стенки в исследуемых группах больных.

Из результатов табл. 4 видно, что параметры суточного мониторинга артериального давления ожидаемо выше в группах с наличием АГ по сравнению с контрольной группой. Показатели среднесуточного, дневного и ночного САД, вариабельности ДАД в ночное время (ВДАД (нч) ($p=0,016; 0,013; 0,025$ и $0,020$, соответственно) исходно были выше в 3-й группе пациентов.

Развитие большинства заболеваний сердечно-сосудистой системы сопровождается не только функциональными изменениями артериальных сосудов, но и структурной перестройкой стенки артерии, смещением соотношения между ее компонентами в сторону увеличения коллагена и снижения эластических волокон, а также прогрессированием атеросклероза [15, 16]. По мнению ряда авторов, жесткость артерий – интегральный фактор, определяющий сердечно-сосудистые риски [15].

Известно, что при артериальной гипертонии регистрируются повышенные показатели СРПВ (PWV) у пациентов с АГ, превышающие нормативные значения (согласно ВОЗ критерии СРПВ должны быть

Таблица 4

Показатели суточного мониторинга АД и эластических свойств сосудистой стенки в обследуемых группах

Показатели	Группа контроля, n=34	p 1 и 2	2-я группа с АГ, n=49	p 2 и 3	3-я группа с АГ и АО, n=58	p 1 и 3
САД24	110,11±9,00	0,0004	122,78±15,89	0,016	131,05±16,03	<0,0001
ДАД24	72,04 ±8,76	0,004	77,68±10,87	0,051	82,41±12,42	<0,0001
САДдн	113,62±9,71	0,001	125,70±15,44	0,013	134,02±16,11	<0,0001
ДАДдн	74,39±6,94	0,006	80,15±9,82		84,51±12,56	<0,0001
САДнч	100,35±9,13	0,0005	116,66±18,32	0,025	123,88±16,22	<0,0001
ДАДнч	62,81±5,18	0,0002	71,68±11,46	0,06	76,61±12,81	<0,0001
ВСАД24	9,48±2,90	0,006	11,71±3,75		11,79±4,07	0,0001
ВДАД24	6,92±1,84	0,001	8,94±2,91		9,23±3,23	0,001
ВСАДдн	9,00 [8,00;12,50]	0,029	12,00 [9,00;15,00]		12,00 [10,00;15,00]	0,0001
ВДАДдн	6,00 [6,00;8,00]	0,001	9,00 [7,25;11,75]		9,00 [7,00;12,00]	0,012
ВСАДнч	8,00 [6,00;9,00]	0,015	10,00 [6,00;13,00]		11,00 [9,00;14,00]	0,001
ВДАДнч	6,00 [4,00;7,25]	0,021	7,00 [5,00;10,00]	0,020	9,00 [7,00;11,00]	0,0001
ЧСС дн	74,50±5,63		67,59±25,59		66,63±23,80	
ЧСС нч	61,75±7,01		52,55±22,68		58,13±21,35	
САVI-г	6,31±2,59	0,05	8,01±2,76	0,048	6,94±3,06	
САVI-л	6,62 ±2,40		6,73±3,93		6,67±3,89	
PWV-г	10,28±2,59	0,001	12,06±4,15		11,95±4,03	0,001
PWV-л	10,17±3,11	0,0002	12,31±4,27		11,97±3,98	0,001

Примечание. САД 24, нч, дн. – систолическое АД за 24 часа, днем, ночью; ДАД – диастолическое АД; ВСАД и ВДАД – вариабельность систолического и диастолического АД; ЧСС – частота сердечных сокращений; САVI – сердечно-лодыжечный сосудистый индекс; PWV – скорость пульсовой волны (г/л- справа/слева).

не более 10 м/с). СРПВ является более сильным предиктором фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых осложнений, чем курение, уровень глюкозы, общий холестерин и другие биологические маркеры. Практически все исследования показывают, что СРПВ достоверно увеличивается с возрастом и зависит от уровня АД во время измерения. Поэтому мы оценивали дополнительно показатель сердечно-лодыжечного индекса (САVI), который позволяет решить проблемы, связанные с воздействием артериального давления. Он отражает истинную жесткость аорты, бедренной и большеберцовой артерии. Этот показатель зависит в большей степени от жесткости и податливости восходящей аорты, что позволяет широко использовать его для диагностики атеросклероза крупных артерий. Патологическим считаются значения САVI от 9,0 и выше. По данным нашего исследования выявлено, что показатель PWV и САVI существенно выше у пациентов 2-й и 3-й группы, с более значимым превышением контрольных значений во 2-й группе пациентов ($p < 0,001$ и $p < 0,05$, соответственно).

За последние годы получены убедительные данные о роли повышенной жесткости сосудистой стенки в прогрессировании АГ и развитии ее основных осложнений. АД является одним из главных факторов, влияющих на жесткость сосудистой стенки. Систолическое и пульсовое давление напрямую зависит от снижения эластичности стенок крупных артерий. В целом ряде исследований показана связь повышения жесткости артериальной стенки с АГ преимущественно за счет увеличения систолического АД, пульсового АД и вариабельности АД [15, 16]. В нашем исследовании влияние артериального давления на жесткость сосудистой стенки подтверждено наличием корреляционных взаимосвязей параметров, в частности: САVI-г с САД нч ($r=0,444$; $p=0,009$), ДАД нч ($r=0,469$, $p=0,005$), ВСАД нч ($r=0,409$, $p=0,018$), ВДАД нч ($r=0,453$, $p=0,008$) во 2-й группе. PWV-г с ДАД нч ($r=0,466$, $p=0,016$), ВДАД 24 ($r=0,522$, $p=0,006$) во 2-й группе и ВДАД 24 ($r=0,316$, $p=0,047$) в 3-й группе.

Кроме этого, в задачи данной работы входило уточнить наличие ассоциации метаболитов микробиоты кишечника с лабораторно-инструментальными параметрами у пациентов в исследуемых группах. Эти данные представлены в табл. 5.

В 1-й группе пациентов выявлены только немногочисленные взаимосвязи параметров метаболома МК с параметрами липидного профиля: С3 (пропионовая) абсолютное содержание с ОХС ($r=-0,745$, $p=0,013$), ХСЛПНП ($r=-0,683$, $p=0,029$); С3 относительное содержание с ТГ ($r=0,663$, $p=0,037$). Во 2-й группе пациентов особенностью является наличие большого количества взаимосвязей метаболитических параметров МК с параметрами суточного мониторинга артериального давления. В 3-й группе пациентов зарегистрировано наибольшее количество корреляций с параметрами воспаления, гормонального статуса и параметрами эластических свойств сосудистой стенки. В целом, представленные в табл. 5 взаимосвязи параметров метаболома микробиоты кишечника с биомаркерами крови, параметрами СМАД и эласти-

ческими свойствами сосудистой стенки в группах с АГ, подтверждают наличие патогенетических звеньев сопряженности метаболизма МК и течения артериальной гипертензии.

Обсуждение. Связь состояния МК с артериальным давлением и развитием АГ находит подтверждение в ряде экспериментальных и клинических работ [2-4]. Опубликованы данные, где авторы указывают на то, что патологические изменения микробиоты кишечника предшествуют дебюту АГ. Ряд клинических исследований подтверждает, что дисбиотические изменения МК присутствуют уже при прегипертензивных состояниях [3,5]. Установлено, что восстановление баланса кишечного микробиома как с помощью диеты, так и с помощью специальной лекарственной терапии может сопровождаться снижением артериального давления без применения антигипертензивных средств.

Патогенетическая связь артериальной гипертензии и дисбиоза опосредована активацией субклинического воспаления как фактора, потенцирующего развитие и прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний [17]. Классическим биомаркером в оценке состояния кишечной микробиоты является соотношение микробных сообществ *Firmicutes* (F) и *Bacteroidetes* (B). Это соотношение (F/B) повышается у крыс со спонтанной гипертензией и у пациентов с эссенциальной АГ, ассоциируясь с нарушением кишечного барьера, более активной пенетрацией липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий в кровотока, сопровождаясь повышенным содержанием бактерий и продуктов их метаболизма с развитием эндотоксемии, что способствует развитию хронического системного воспаления и нарушению иммунологической защиты организма [18-20]. Таким образом, повышенная проницаемость кишечника способствует формированию замкнутого круга, приводящего к прогрессированию повышенной транслокации эндотоксина и накоплению воспалительных цитокинов.

Проблема доказательства связи метаболома микробиоты кишечника с рядом сердечно-сосудистых заболеваний является чрезвычайно актуальной во всем мире. В нашей работе рассмотрена ассоциация метаболитических параметров МК со структурно-функциональным состоянием сосудистой стенки. Таких исследований пока недостаточно, поэтому наша работа весьма актуальна. Выявлены взаимосвязи параметров метаболома микробиоты кишечника с параметрами жесткости сосудистой стенки: С4 (абсолютное содержание масляной кислоты) и САVI-R; суммарное содержание кислот и PWV-R; С2 (абсолютное содержание уксусной кислоты) и PWV-R в обеих группах пациентов с артериальной гипертензией.

Особенность наличия многочисленных ассоциаций метаболитов МК с параметрами воспалительной реакции и ремоделирования тканей – ТМА с ИЛ-1 β ($p=0,042$), GDF15 ($p=0,007$), гомоцистеином ($p=0,005$), вч-СРБ ($p=0,017$); FABP с вч-СРБ ($p=0,017$) и GDF-15 ($p=0,043$); КЦЖК с ФНО- α ($p=0,015$) и лептином ($p=0,005$) в 3-й группе пациентов расширяет потенциальные границы ис-

Таблица 5

Корреляции параметров метаболитов микробиоты кишечника с лабораторно-инструментальными данными в группах пациентов с АГ

Показатели	2-я группа с АГ, n=49	3-я группа с АГ и АО, n=58
ТМА	САД ₂₄ ($r=0,807, p=0,052$)	ИЛ-1 β ($r=-0,458, p=0,042$) GDF15 ($r=0,648, p=0,007$) Гомоцистеин ($r=0,580, p=0,005$)
ТМАО	ЧСС ₂₄ ($r=-0,391, p=0,048$) ЧСС _{дн} ($r=-0,403, p=0,030$)	ИЛ-1 β ($r=-0,506, p=0,023$) GDF15 ($r=0,645, p=0,007$) Гомоцистеин ($r=0,549, p=0,008$)
ТМА/ТМАО		ИЛ-1 β ($r=0,561, p=0,010$) вч-СРБ ($r=0,514, p=0,042$)
FABP2	САД _{днч} ($r=-0,426, p=0,027$) ДАД _{днч} ($r=-0,458, p=0,016$)	вч-СРБ ($r=0,447, p=0,017$) GDF15 ($r=-0,385, p=0,043$)
КЦЖК C2, абсолютное содержание	ВДАД _{днч} ($r=-0,877, p=0,022$) ИЛ1 β ($r=0,787, p=0,036$) ИЛ6 ($r=0,915, p=0,004$) Адипонектин ($r=-0,823, p=0,023$) PWV-R ($r=0,530, p=0,055$)	PWV-R ($r=0,425, p=0,049$) Лептин ($r=-0,561, p=0,007$)
C3, абсолютное содержание	ВСАД _{днч} ($r=-0,356, p=0,026$) ВДАД _{днч} ($r=-0,378, p=0,018$) ЧСС ₂₄ ($r=-0,393, p=0,047$) ЧСС _{дн} ($r=-0,396, p=0,033$) ИЛ6 ($r=0,858, p=0,014$) Адипонектин ($r=-0,812, p=0,027$)	Лептин ($r=-0,535, p=0,010$)
C4, абсолютное содержание	ВДАД _{днч} ($r=-0,848, p=0,033$) ИЛ1 β ($r=0,787, p=0,036$) ИЛ6 ($r=0,914, p=0,004$) адипонектин ($r=-0,846, p=0,017$)	Лептин ($r=-0,584, p=0,004$)
Суммарное содержание ИзоСп изоС4+изоС5+изоС6	ИЛ10 ($r=-0,941, p=0,002$)	ИЛ-6 ($r=0,436, p=0,048$)
C2 (ускусная), относительное содержание		ФНО- α ($r=0,578, p=0,015$) Лептин ($r=0,437, p=0,042$)
C3 (пропионовая), относительное содержание	ИЛ6 ($r=-0,789, p=0,035$) Лептин ($r=0,739, p=0,058$)	САД _{днч} ($r=0,411, p=0,058$) ИЛ-10 ($r=-0,466, p=0,033$) Гомоцистеин ($r=0,401, p=0,058$)
C4 (масляная), относительное содержание	Гомоцистеин ($r=-0,742, p=0,056$) Лептин ($r=-0,820, p=0,024$)	САVI-R ($r=-0,466, p=0,029$) Лептин ($r=-0,477, p=0,025$)
Суммарное содержание ИзоСп изоС4+изоС5+изоС6	САД _{днч} ($r=-0,820, p=0,046$) ДАД _{днч} ($r=-0,886, p=0,019$) ЧСС ₂₄ ($r=0,953, p=0,047$) ЧСС _{дн} ($r=0,949, p=0,051$) ИЛ1 β ($r=0,772, p=0,042$)	Лептин ($r=0,591, p=0,004$)
ИзоСп/Сп / ИЗОС5/С5		
Суммарное содержание C2+C3+C4+C5+C6+ изоС4+изоС5+изоС6	ДАД _{днч} ($r=-0,876, p=0,022$) ИЛ6 ($r=0,901, p=0,006$) адипонектин ($r=-0,824, p=0,023$) лептин ($r=-0,770, p=0,043$)	PWV-R ($r=0,441, p=0,041$) Лептин ($r=-0,580, p=0,005$)
Анаэробный индекс (C2-C4), ед.		ФНО- α ($r=0,561, p=0,019$) Лептин ($r=0,460, p=0,031$)

следования влияния перечисленных маркеров на структурно-функциональное состояние сосудов и миокарда у больных АГ с разной степенью абдоминального ожирения.

Заключение. В ходе работы выявлено, что наибольшее изменение уровней метаболитов микробиома кишечника зарегистрировано во 2-й и 3-й группах пациентов. Выявленные корреляционные взаимосвязи параметров метаболома микробиоты кишечника с биохимическими, неспецифическими воспалительными и гормональными биомаркерами, параметрами суточного мониторинга артериального давления и эластическими свойствами сосудистой стенки, мо-

гут обозначить роль микробиоты кишечника как фактора, влияющего на патогенетические звенья развития и прогрессирования артериальной гипертензии.

Активный интерес исследователей во всем мире к микробиоте кишечника и влиянию метаболома МК на развитие, прогрессирование и исходы сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, артериальной гипертензии, не случаен. Новое понимание сложного и разностороннего взаимодействия микроорганизмов и макроорганизма во всем его раскрывающемся многообразии, является многообещающим с точки зрения формирования новых подходов к профилактике и лечению данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 18-20 см. REFERENCES)

1. Шляхто Е.В., Баранова Е.И. Основные направления снижения сердечно-сосудистой смертности: что можно изменить уже сегодня? *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(7):3983. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-3983.
2. Ляпина И.Н., Завырылина П.Н., Начева Л.В. Микробиота кишечника – новый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. *Сибирское медицинское обозрение*. 2021; (4):26-33. DOI: 10.20333/25000136-2021-4-26-33.
3. Драпкина О.М., Жамалов Л.М. Микробиота кишечника — новый фактор риска атеросклероза? *Профилактическая медицина*. 2022; 25(11):72–7. DOI: 10.17116/profmed20222511172.
4. Драпкина О.М., Кабурова А.Н. Кишечная микробиота-новый спутник на маршруте сердечно-сосудистых заболеваний: неожиданные роли старых соседей. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2016; 12(1):66-71. DOI: 10.20996/1819-6446-2016-12-1-66-71.
5. Афинеевская А.Ю., Мальков О.А., Говорухина А.А. Роль кишечной микробиоты в патогенезе атеросклероза и перспективные меры профилактики (обзор). *Журнал медико-биологических исследований*. 2020; 8(2):184–93. DOI: 10.37482/2542-1298-Z009.
7. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н. Феномен проницаемости кишечной стенки и его взаимосвязь с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Современные представления о проблеме. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020; 19(3):2474. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-24746.
8. Драпкина О.М., Широких О.Е. Роль кишечной микробиоты в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. 2018; 14(4):567-74. DOI: 10.20996/1819-6446-2018-14-4-567-574.
9. Симаненков В.И., Маев И.В., Ткачева О.Н. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике. Мультидисциплинарный национальный консенсус. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021; 20(1): 62758. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2758.
10. Достанко Н.Ю., Ягур В.Е., Зыбалова Т.С. Вклад микробиоты в развитие, прогрессирование и исходы сердечно-сосудистых заболеваний. Обзор литературы. *Кардиология в Беларуси*. 2022; 5:642-52. DOI: 10.34883/PI.2022.14.5.010.
11. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Бутрова С.А. Жировая ткань как эндокринный орган. *Ожирение и метаболизм*. 2006; 3(1):6-13. DOI: 10.14341/2071-8713-4937.
13. Маркова Т.Н., Мищенко Н.К., Петина Д.В. Адипоцитокины: современный взгляд на дефиницию, классификацию и роль в организме. *Проблемы эндокринологии*. 2022; 68(1):73-80. DOI: 10.14341/probl12805.
14. Вербовой А.Ф., Цинава И.А., Вербовая Н.И. резистин марке сердечно-сосудистых заболеваний. *Ожирение и метаболизм*. 2017; 14(4):5-9. DOI: 10.14341.omet.2017.9.
15. Кириченко Л.Л., Гацура С.В., Голосова А.Н., Дворянчикова Ж. Ю., Ульянова Е. А., Чуприкова К. М. и др. Жесткость сосудистой стенки при артериальной гипертензии и возможности ее модуляции. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2016; 15(6): 83–8.
16. Остроумова О.Д., Кочетков А.И., Копченков И.И., Гусева Т.Ф., Бондарец О.В. Жесткость сосудистой стенки у пациентов с артериальной гипертензией. *Системные гипертензии*. 2015; 12(2): 43–8.
17. Баранцевич Н.Е., Конради А.О., Баранцевич Е.П. Артериальная гипертензия: роль микробиоты кишечника. *Артериальная гипертензия*. 2019; 25(5):460-6. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-460-46623.
3. Drapkina O.M., Zhamalov L.M. Gut microbiota: a new risk factor for atherosclerosis? *Profilakticheskaya meditsina*. 2022; 25(11):72–7. DOI: 10.17116/profmed20222511172. (in Russian)
4. Drapkina O.M., Kaburova A.N. Gut microbiota – a new companion on the path of cardiovascular diseases progression: surprising roles of long-time neighbors. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2016; 12(1):66-71. DOI: 10.20996/1819-6446-2016-12-1-66-71. (in Russian)
5. Afineevskaya A.Yu., Mal'kov O.A., Govorukhina A.A. The Role of Intestinal microbiota in the pathogenesis of atherosclerosis and promising preventive measures (review). *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2020; 8(2): 184–93. DOI: 10.37482/2542-1298-Z009. (in Russian)
6. Bielinska K., Radkowski M., Grochowska M., Perlejewski K., Huc T., Jaworska K. et al. High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition*. 2018; 54:33-9. DOI: 10.1016/j.nut.2018.03.004. Epub. 2018 Mar 22. PMID: 29705499.
7. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N. The phenomenon of intestinal permeability and its association with cardiovascular disease. Current status. *Kardiovaskulyarnaya terapiya I profilaktika*. 2020; 19(3):2474. DOI: 10.15829/1728-8800-2020-24746. (in Russian)
8. Drapkina O.M., Shirobokikh O.E. Role of Gut Microbiota in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases and Metabolic Syndrome. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2018; 14(4):567-74. DOI: 10.20996/1819-6446-2018-14-4-567-574. (in Russian)
9. Simanenkov V.I., Maev I.V., Tkacheva O.N. Syndrome of increased epithelial permeability in clinical practice. Multidisciplinary national consensus. *Kardiovaskulyarnaya terapiya I profilaktika*. 2021; 20(1):62758. DOI: 10.15829/1728-8800-2021-2758. (in Russian)
10. Dumas M.E., Maibaum E.C., Teague C., Ueshima H., Zhou B., Lindon J.C. et al. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the intermap study. *Anal. Chem*. 2006; 78(7):2199-2208. DOI: 10.1021/ac0517085.
11. Dostanko N.Yu., Yagur V.E., Zyalalova T.S. The contribution of the microbiota to the development, progression and outcomes of cardiovascular diseases. Literature review. *Kardiologiya v Belarusi*. 2022; 5:642-52. DOI: 10.34883/PI.2022.14.5.010. (in Russian)
12. Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Butrova S.A. Adipose tissue as an endocrine organ. *Ozhirenie I metabolism*. 2006; 3(1):6-13. DOI: 10.14341/2071-8713-4937. (in Russian)
13. Markova T.N., Mishchenko N.K., Petina D.V. Adipocytokines: modern definition, classification and physiological role. *Problemy endokrinologii*. 2022; 68(1):73-80. DOI: 10.14341/probl12805. (in Russian)
14. Verbovoy A.F., Tsinava I.A., Verbovaya N.I. Resistin brand of cardiovascular disease. *Ozhirenie I metabolism*. 2017; 14(4):5-9. DOI: 10.14341.omet.2017.9. (in Russian)
15. Kirichenko L.L., Gatsura S.V., Golosova A.N., Dvoryanchikova Zh.Yu., Ul'yanova E. A., Chuprikova K. M. et al. Stiffness of the vascular wall in arterial hypertension and the possibility of its modulation. *Kardiovaskulyarnaya terapiya I profilaktika*. 2016; 15(6): 83-8. (in Russian)
16. Ostroumova O.D., Kochetkov A.I., Kopchenov I.I. Guseva T.F., Bondarets O.V. The hardness of the vessel wall in patients with arterial hypertension. *Sistemnye gipertenzii*. 2015; 12(2): 43–8. (in Russian)
17. Barantsevich N.T., Konradi A.O., Barantsevich E.P. Arterial hypertension: The role of gut microbiota. *Arteriálnaya gipertenziya*. 2019; 25(5):460-6. DOI: 10.18705/1607-419X-2019-25-5-460-46623. (in Russian)
18. Moran-Ramos S., López-Contreras B.E., Canizales-Quinteros S. Gut microbiota in obesity and metabolic abnormalities: a matter of composition or functionality? *Archives of Medical Research*. 2017; 48(8):735-53. DOI: 10.1016/j.arcmed.2017.11.003.
19. Lau K., Srivatsav V., Rizwan A., Nashed A., Liu R., Shen R. et al. Bridging the gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2017; 9:859. DOI: 10.3390/nu9080859.
20. Tang W.H., Kitai T., Hazen S.L. Gut microbiota cardiovascular health and disease. *Circulation Research*. 2017; 31; 120(7):1183-96. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.3097158.

REFERENCES

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Любимова Н.В., Лебедева А.В., Тимофеев Ю.С., Вашкетова О.И., Карамышева Е.И., Делекторская В.В., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е.

ФАКТОРЫ РОСТА CTGF И TGF- β 1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ НЕЙРОЭНДОКРИННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Фактор роста соединительной ткани (CTGF) и трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) являются медиаторами карциноид-ассоциированного фиброза при нейроэндокринных опухолях (НЭО). Исследование факторов роста в крови больных НЭО дает возможность оценить их связь с клиническими и морфологическими особенностями опухолей. Провели сравнительный анализ концентрации CTGF и TGF- β 1 в сыворотке крови больных НЭО и у практически здоровых людей. Обследовали 64 больных НЭО различных локализаций (23 больных – поджелудочная железа, 20 – тонкая кишка, 10 – легкие, 6 – толстая кишка, 5 – НЭО из не выявленного первичного очага), при этом у 42 пациентов были обнаружены признаки карциноидного синдрома, у 16 больных, по данным эхокардиографии, установлена карциноидная болезнь сердца (КБС). В группу контроля вошли 20 практически здоровых людей. Иммуноферментный анализ проводили на полуавтоматическом анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens) с использованием стандартизованных наборов: Human connective tissue growth factor (CTGF) ELISA Kit (Avisera Bioscience, Inc) и Human TGF beta1 ELISA Kit (Bender MedSystems GmbH). Показано, что частота обнаружения CTGF в сыворотке крови была наиболее высокой у пациентов с карциноидным синдромом, осложненным КБС (37,5%), с превышением, более чем в 3 раза фактора роста у больных с карциноидным синдромом, но без признаков кардиофиброза (11,5%). В то же время у всех пациентов без карциноидного синдрома, а также у практически здоровых людей фактор роста не выявлялся. Для TGF- β 1 получено статистически значимое ($p < 0,05$) превышение медианы концентрации в сыворотке крови больных НЭО со степенью злокачественности Grade 3 (32,9 нг/мл) по сравнению с медианами при Grade 1 (22,0 нг/мл) и Grade 2 (24,6 нг/мл), а также в группе контроля (24,5 нг/мл). Выявлена связь CTGF с развитием опухоль-ассоциированного кардиофиброза. Показано, что концентрация TGF- β 1 связана со степенью злокачественности НЭО.

Ключевые слова: нейроэндокринные опухоли; фактор роста соединительной ткани; CTGF; трансформирующий фактор роста; TGF- β 1.

Для цитирования: Любимова Н.В., Лебедева А.В., Тимофеев Ю.С., Вашкетова О.И., Карамышева Е.И., Делекторская В.В., Стилиди И.С., Кушлинский Н.Е. Факторы роста CTGF и TGF- β 1 в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 199-202. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-199-202>

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 09.02.2023

Принята к печати 28.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

Lyubimova N.V., Lebedeva A.L., Timofeev Yu.S., Vashketova O.I., Karamysheva E.I., Delectorskaya V.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E.

GROWTH FACTORS CTGF AND TGF- β 1 IN THE BLOOD SERUM OF NEUROENDOCRINE TUMOR PATIENTS

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 15552, Moscow, Russia

Connective tissue growth factor (CTGF) and transforming growth factor beta (TGF- β 1) are mediators of carcinoid-associated fibrosis in neuroendocrine tumors (NETs). The investigation of growth factors in the blood of NET patients gives the possibility to reveal their association with the clinical and morphological features of tumors. A comparative analysis of the concentration of CTGF and TGF- β 1 in the blood serum of patients with NET and in practically healthy people was carried out. 64 patients with NETs of various localizations (23 patients – pancreas, 20 – small intestine, 10 – lungs, 6 – large intestine, 5 – NETs from an unidentified primary lesion) were examined, moreover 42 patients had signs of carcinoid syndrome, 16 – carcinoid heart disease according to echocardiograms. Control group included 20 practically healthy people. Enzyme immunoassay was performed on a BEP 2000 Advance semiautomatic analyzer (Siemens) using standardized kits: Human connective tissue growth factor (CTGF) ELISA Kit (Avisera Bioscience, Inc) and Human TGF beta1 ELISA Kit (Bender MedSystems GmbH). The frequency of CTGF detection in blood serum was the highest in patients with carcinoid syndrome complicated by carcinoid heart disease (37.5%), more than 3 times higher than the frequency of factor detection in patients with carcinoid syndrome, but without signs of cardiofibrosis (11.5%). At the same time, in all patients without carcinoid syndrome and in practically healthy people the factor was not detected. For the TGF- β 1 median concentration in the group of NET patients with Grade 3 (32.9 pg/ml) was statistically significant ($p < 0.05$) higher than medians in NET patients with Grade 1 (22.0 pg/ml) and Grade 2 (24.6 pg/ml) as well as the control group (24.5 pg/ml). The investigation reveals an association of CTGF with the development of tumor-associated cardiofibrosis. TGF- β 1 concentration was associated with tumor malignancy (Grade).

Key words: neuroendocrine tumors; connective tissue growth factor; CTGF; transforming growth factor; TGF- β 1.

For citation: Lyubimova N.V., Lebedeva A.L., Timofeev Yu.S., Vashketova O.I., Karamysheva E.I., Delectorskaya V.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E. Growth factors CTGF and TGF- β 1 in the blood serum of neuroendocrine tumor patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 199-202 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-199-202>

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>;
Lebedeva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5881-1795>;
Timofeev Yu.S., <https://orcid.org/0000-0001-9305-6713>;
Vashketova O.I., <https://orcid.org/0000-0003-3387-6634>;
Karamisheva E.I., <https://orcid.org/0000-0001-8791-5358>;
Delektorskaya V.V., <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>;
Stilidi I.V., <http://orcid.org/0000-0002-0493-1166>;
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 09.02.2023

Accepted 28.02.2023

Published 00.04.2023

Введение. Нейроэндокринные опухоли (НЭО) являются новообразованиями, для которых характерна продукция и секреция в циркуляторное русло ряда пептидов, биогенных аминов, гормонов и факторов роста [1, 2]. Несмотря на прогресс в области лабораторной диагностики НЭО и широкого использования в клинической практике таких соединений, как хромогранин А, серотонин, 5-ГИУК, панкреатический полипептид, гастрин и т.д., остается ряд проблем, связанных с недостаточной чувствительностью и специфичностью применяемых маркеров, возможностью их использования в мониторинге течения заболевания и оценке гиперфункциональных синдромов [3–5]. В этом ключе поиск новых маркеров НЭО является актуальной задачей, как в клиническом аспекте, так и с точки зрения фундаментального понимания процессов, лежащих в основе развития нейроэндокринных неоплазий. Исследование факторов роста является одним из перспективных направлений в детализации молекулярных особенностей НЭО [6]. Данные соединения не только участвуют в пролиферации и росте опухоли, но и стимулируют фибротические процессы, среди которых наиболее опасным состоянием является развивающийся при карциноидном синдроме кардиофиброз [7–9]. С точки зрения патогенеза НЭО и их осложнений, особый интерес представляют фактор роста соединительной ткани и трансформирующий фактор роста, которые рассматриваются в качестве ключевых профибротических компонентов.

Фактор роста соединительной ткани (Connective Tissue Growth Factor, CTGF) представляет собой белковую молекулу, состоящую из 4-х богатых цистеином доменов [10]. CTGF выполняет различные биологические функции, включая регуляцию дифференцировки, пролиферации, миграции, гипертрофии, продукцию фибронектина, стимуляцию или ингибирование ангиогенеза, взаимодействия с клеточным матриксом [11]. Повышенная секреция CTGF наблюдается при различных хронических заболеваниях, включая фиброз печени, системный склероз, нефропатию и хроническую почечную недостаточность, интерстициальную пневмонию, кардиомиопатию, атеросклероз и перитонеальный фиброз [11, 12]. В некоторых работах авторы отмечают связь CTGF с развитием фибротических про-

цессов различного характера, включая кардиофиброз [13, 14]. В работе L.E. Dorn и соавт. [15] описано, что продуцируемый при НЭО CTGF проявляет свойства ауто- и паракринного про-фибротического фактора, приводя к развитию кардиофиброза.

Другим фактором роста, патогенетически связанным с процессами фиброза, является трансформирующий фактор роста бета (Transforming Growth Factor β) – TGF- β , представленный в виде трех изоформ (β 1, β 2, β 3) [16, 17]. Данный фактор отвечает за пролиферацию фибробластов и дифференцировку в миофибробласты, усиливает продукцию коллагена и стимулирует активность других факторов роста, таких как эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста и охарактеризованный ранее CTGF [18]. TGF- β играет важную роль в развитии карциноидного кардиофиброза. В литературе описана повышенная экспрессия TGF- β в очагах фиброза на клапанах сердца больных НЭО с карциноидной болезнью сердца, при этом не было выявлено связи концентраций фактора в плазме крови с развитием КБС [19, 20]. Существуют свидетельства, согласно которым TGF- β 1 индуцирует действие CTGF на фибробласты, что, в конечном итоге, также способствует развитию карциноид-ассоциированного фиброза [16].

Анализ сывороточных концентраций CTGF и TGF- β позволит оценить их патогенетическое значение, а также возможный потенциал в качестве биохимических маркеров карциноидной болезни сердца.

Цель исследования – сравнительный анализ концентрации CTGF и TGF- β 1 в сыворотке крови больных нейроэндокринными опухолями и у практически здоровых людей.

Материал и методы. Проведено обследование 64 больных с нейроэндокринными опухолями различных локализаций, в возрасте от 32 до 80 лет, среди которых были 28 мужчин и 36 женщин. В анализируемой выборке представлены следующие локализации НЭО: поджелудочная железа – у 23 больных, тонкая кишка – у 20, легкие – у 10, толстая кишка – у 6, метастазы НЭО из не выявленного первичного очага – у 5 больных. У всех включенных в исследование больных диагноз НЭО был подтвержден данными морфологического исследования новообразования.

Степень злокачественности опухолей оценивали по шкале Grade. Согласно клиническим данным, у 44 пациентов были выявлены метастазы в печени, у 42 – признаки карциноидного синдрома. У 16 больных, по данным эхокардиографического обследования, выявлена карциноидная болезнь сердца (КБС).

В контрольной группе обследовали 20 здоровых пациентов: мужчин ($n=8$) и женщин ($n=12$) в возрасте от 28 до 80 лет.

Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, с соблюдением этических принципов Хельсинской Декларации ВМА 1964 г. (ред. 2013 г.) и Правилами клинической практики в Российской Федерации, утвержденными приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 200Н. Исследование выполнено с информированного согласия пациентов на участие в исследовании.

Взятие крови для иммуноферментных исследований проводили в утренние часы натощак из кубитальной вены. После обработки сыворотку крови замораживали и хранили при температуре -30°C . Проведение иммуноферментного анализа осуществляли в микропланшетном формате на полуавтоматическом анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens, Германия) с использованием стандартизованных наборов реактивов «Human connective tissue growth factor (CTGF) ELISA Kit (Avisera Bioscience, Inc, США)», «Human TGF beta1 ELISA Kit (Bender MedSystems GmbH, Австрия)».

Статистический анализ проводился с использованием пакета программ Statistica (Statsoft). Различия принимались как статистически значимые при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение. Концентрации СТGF были определены в сыворотке крови 64 больных НЭО, при этом только в 14,2% уровни показателя были выше аналитической чувствительности метода (15 пг/мл) при вариабельности значений в целом по группе от 0 до 513 пг/мл. Следует отметить, во всех образцах контрольной группы концентрации СТGF были ниже аналитической чувствительности метода. В связи с этим анализ результатов проводили качественно – оценивали частоту выявления СТGF в сыворотке крови пациентов.

Анализ частоты выявления СТGF статистически значимо ($p=0,019$) показал, что у больных с клиникой карциноидного синдрома фактор роста соединительной ткани выявляли в 20,5% случаев, тогда как у больных без признаков карциноидного синдрома не было выявлено ни одного случая превышения аналитической чувствительности метода. В то же время у больных с КБС частота обнаружения СТGF достигала 37,5% и была статистически значимо ($p=0,0018$) выше, чем у больных без признаков кардиофиброза – 6,6%.

Для более детального анализа частоты выявления СТGF в зависимости от проявления карциноидной симптоматики пациентов разделили на три группы: 1-я группа – больные с карциноидным синдромом и КБС, 2-я – больные с карциноидным синдромом, но без КБС, 3-я – больные без карциноидного синдрома и без КБС (табл. 1). При этом частота выявления СТ-

GF в 1-й группе (КС+, КБС+) была наиболее высокой и составила 37,5%, что было статистически значимо выше ($p=0,047$), чем у больных 2-й группы (КС+, КБС-), где уровни СТGF выявлялись в 11,5% случаях.

Таким образом, частота выявления СТGF была наиболее высокой у пациентов с карциноидным синдромом, осложненным КБС, более чем в 3 раза превышая частоту выявления у пациентов с карциноидным синдромом, но без поражения сердца. В то же время, у всех пациентов без карциноидного синдрома, а также у практически здоровых людей СТGF был ниже аналитического уровня.

При анализе результатов определения концентрации TGF- β 1 в сыворотке крови больных НЭО статистически значимых различий от уровней, полученных в группе контроля, не было выявлено (табл. 2). Также не было получено статистически значимых различий в зависимости от типа НЭО и распространенности процесса. В то же время было получено статистически значимое ($p<0,05$) превышение медианы концентраций TGF- β 1 у больных НЭО со степенью злокачественности Grade 3 (32,9 нг/мл) относительно больных НЭО с Grade 1 (22,0 нг/мл) и Grade 2 (24,6 нг/мл), а также контроля (24,5 нг/мл).

Анализ с учетом клинической симптоматики не выявил различий уровней TGF- β в зависимости от наличия карциноидного синдрома, при этом у больных с КБС медиана TGF- β была несколько ниже, чем при отсутствии данного осложнения.

Полученные нами результаты подтверждают данные других исследований о связи факторов роста с развитием НЭО и их осложнений. Так, в работе M. Kidd и соавт. [13] методом ИФА определяли концентрации целой молекулы СТGF-W и N-концевого фрагмента (СТGF-N) в сыворотке крови, при этом следует отметить, что в исследовании применялись разработанные авторами наборы реактивов. Согласно полученным авторами данным, наблюдалось статистически значимое превышение концентрации СТGF в группе больных НЭО тонкой кишки относительно других гастроинтестинальных НЭО, а также была выявлена корреляция между уровнями фактора в сыворотке крови и опухолевой ткани. В исследовании D.S. Bergestuen и соавт. [14], в котором анализировали уровни СТGF в плазме крови больных НЭО кишечника (в основном, тонкой кишки), повышенные уровни фактора были ассоциированы с правожелудочковой недостаточностью, что подтверждает значение СТGF в развитии и прогресс-

Таблица 1

Частота выявления СТGF в сыворотке крови больных НЭО и в контроле

Группы обследуемых	n	Частота выявления СТGF (>15 пг/мл), %
1-я группа: КС+, КБС+	16	37,5
2-я группа: КС+, КБС-	26	11,5
3-я группа: КС-, КБС-	22	0,0
Контрольная группа	20	0,0

Примечание. $p(1\text{vs}2)=0,0047$, $p(1\text{vs}3)=0,0017$, $p(2\text{vs}3)=0,09$.

Таблица 2

Концентрация TGF (нг/мл) в сыворотке крови больных НЭО и в контроле

Группа	Медиана	Квартили
Общая группа НЭО	25,6	20,3-34,9
Карциноидный синдром:		
КС +	25,4	17,9-34,9
КС -	25,6	21,4-35,9
Карциноидная болезнь сердца:		
КБС +	17,2	12,3-32,3
КБС -	26,4	22,5-35,5
Метастазы в печени:		
МТС +	24,5	17,6-32,8
МТС -	23,9	19,3-32,9
Степень злокачественности:		
Grade 1	22	12,9-47,1
Grade 2	24,6	5,9-47,4
Grade 3*	32,9	23,6-48,2
Контрольная группа	24,5	13,8-30,09

Примечание. * – p – (Grade 3 vs Grade 1)=0,035, p – (Grade 3 vs Grade 2)=0,028, p – (Grade 3 vs контроль) = 0,028.

сировании кардиофиброза у больных НЭО, а также позволяет рассматривать CTGF как возможный маркер ранних стадий КБС. Эти результаты согласуются с полученными нами данными о связи концентраций CTGF с карциноидным кардиофиброзом при НЭО. Примечательно, что секреция CTGF не выявлялась у больных без признаков карциноидного синдрома, что может свидетельствовать о специфичности данного фактора в обнаружении фибротических изменений, ассоциированных с карциноидным синдромом.

В исследовании Udelnow и соавт. [21] выявлено увеличение уровня TGFβ при НЭО тонкой кишки. В нашей работе более высокие уровни фактора роста были характерны для опухолей с наиболее высокой степенью злокачественности, среди которых были НЭО тонкой кишки, поджелудочной железы и легкого.

Заключение. Нами впервые проведены исследования факторов роста CTGF и TGFβ у больных НЭО. Полученные результаты подтверждают связь CTGF с развитием карциноидной болезни сердца и открывают определенные перспективы для оценки CTGF как потенциального биохимического маркера карциноидного кардиофиброза. Представленные данные подтверждают целесообразность исследований факторов роста при НЭО в зависимости от их локализации, степени злокачественности и других клинико-морфологических характеристик на больших выборках пациентов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-21 см. REFERENCES)

5. Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Чурикова Т.К., Кузьминов А.Е., Кушлинский Н.Е., Значение хромогранина А в диагностике и прогнозе нейроэндокринных опухолей. *Медицинский алфавит*. 2019; 17(2):19–22.

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.
- Hofland J., Kaltsas G., de Herder W.W. Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr. Rev.* 2020; 41(2):371–403.
- Ciobanu O.A., Martin S., Fica S. Perspectives on the diagnostic, predictive and prognostic markers of neuroendocrine neoplasms (Review). *Exp. Ther. Med.* 2021; 22(6):1479.
- Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Churikova T.K., Kuzminov A.E., Kushlinskii N.E. Significance of chromogranin A in the diagnosis and prognosis of neuroendocrine tumors. *Meditsinskiy alfavit*. 2019; 17(2):19–22. (in Russian)
- Kalligeros M., Diamantopoulos L., Toumpanakis C. Biomarkers in Small Intestine NETs and Carcinoid Heart Disease: A Comprehensive Review. *Biology (Basel)*. 2021; 10(10):950.
- Fanciulli G., Ruggeri R.M., Grossrubatscher E., Calzo F.L., Wood T.D., Faggiano A. et al. A Serotonin pathway in carcinoid syndrome: Clinical, diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2020; 21(4):599–612.
- Laskaratos F.M., Rombouts K., Caplin M., Toumpanakis C., Thirlwell C., Mandair D. Neuroendocrine tumors and fibrosis: An unsolved mystery? *Cancer*. 2017; 123(24):4770–90.
- Jin C., Sharma A.N., Thevakumar B., Majid M.A., Chalaby S., Takahashi N. et al. Carcinoid Heart Disease: Pathophysiology, Pathology, Clinical Manifestations, and Management. *Cardiology*. 2021; 146(1):65–73.
- Jacobson A., Cunningham J.L. Connective tissue growth factor in tumor pathogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012; 5(1):S8.
- Dendooven A., Gerritsen K.G., Nguyen T.Q., Kok R.J., Goldschmeding R. Connective tissue growth factor (CTGF/CN2) ELISA: a novel tool for monitoring fibrosis. *Biomarkers*. 2011; 16(4):289–301.
- Gerritsen K.G., Falke L.L., van Vuuren S.H., Leeuwis J.W., Broekhuizen R., Nguyen T.Q. et al. Plasma CTGF is independently related to an increased risk of cardiovascular events and mortality in patients with atherosclerotic disease: the SMART study. *Growth Factors*. 2016; 34(3-4):149–58.
- Kidd M., Modlin I., Shapiro M., Camp R., Mane S., Usinger W. et al. CTGF, intestinal stellate cells and carcinoid fibrogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(39):5208–16.
- Bergestuen D.S., Gravning J., Haugaa K.H., Sahakyan L.G., Aakhus S., Thiis-Evensen E. et al. Plasma CCN2/connective tissue growth factor is associated with right ventricular dysfunction in patients with neuroendocrine tumors. *BMC Cancer*. 2010; 10:6.
- Dom L.E., Petrosino J.M., Wright P., Accornero F. CTGF/CN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2018; 121:205–11.
- Modlin I.M., Shapiro M.D., Kidd M. Carcinoid tumors and fibrosis: an association with no explanation. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99(12):2466–78.
- Koumarianou A., Alexandraki K.I., Wallin G., Kaltsas G., Daskalakis K. Pathogenesis and Clinical Management of Mesenteric Fibrosis in Small Intestinal Neuroendocrine Neoplasms: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* 2020; 9(6):1777.
- Spoladore R., Falasconi G., Fiore G., Di Maio S., Preda A., Slavich M. et al. Cardiac fibrosis: emerging agents in preclinical and clinical development. *Exp. Opin. Invest. Drugs*. 2021; 30(2):153–66.
- Waltenberger J., Lundin L., Oberg K., Wilander E., Miyazono K., Heldin C.H. et al. Involvement of transforming growth factor-beta in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *Am. J. Pathol.* 1993; 142(1):71–8.
- Zuetenhorst J.M., Bonfrer J.M., Korse C.M., Bakker R., van Tinteren H., Taal B.G. Carcinoid heart disease: the role of urinary 5-hydroxyindoleacetic acid excretion and plasma levels of atrial natriuretic peptide, transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor. *Cancer*. 2003; 97(7):1609–15.
- Udelnow A., Jechorek D., Wex C., Klose S., Pech M., Reinhold A. et al. Possible role of TGF β1 in inflammatory pseudotumor associated with multiple neuroendocrine tumors of the small intestine. *Pathol. Res. Pract.* 2015; 211(10):805–9.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г.

НЕОПТЕРИН В КАЧЕСТВЕ КАРДИОВАСКУЛЯРНОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО МАРКЕРА ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Неоптерин – пуриновый нуклеотид, продуцируемый в ответ на воспалительные реакции. При любом состоянии, связанном с активацией иммунного ответа и воспалением, уровень неоптерина значительно повышается. Поскольку патофизиологические аспекты сердечной недостаточности включают воспалительные реакции, логично, что уровни неоптерина должны быть высокими у пациентов с данной патологией. Цель представленного обзора литературы – рассмотреть неоптерин в качестве нового маркера при сердечной недостаточности. Проведенные к настоящему времени исследования, посвященные неоптерину, указывают на потенциально важную диагностическую и прогностическую значимость оценки данного маркера у пациентов с сердечной недостаточностью. Дальнейшие научно-клинические исследования, возможно, продемонстрируют еще более убедительные перспективы использования неоптерина в качестве дополнительного лабораторного инструмента для диагностики, стратификации риска и прогнозирования неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с сердечной недостаточностью. Определение концентраций неоптерина для оценки эффективности лекарственной терапии при сердечной недостаточности еще предстоит дополнительно изучить, чтобы сделать окончательный вывод.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания; воспаление; биологические маркеры; неоптерин; обзор.

Для цитирования: Алиева А.М., Теплова Н.В., Байкова И.Е., Котикова И.А., Никитин И.Г. Неоптерин в качестве кардиоваскулярного биологического маркера при сердечной недостаточности (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 203-209. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-203-209>

Для корреспонденции: Алиева Амина Магомедовна, канд. мед. наук, доц. каф. госпитальной терапии им. академика Г.И. Сторожакова; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.02.2023

Принята к печати 28.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G.

NEOPTERIN AS A CARDIOVASCULAR BIOLOGICAL MARKER IN HEART FAILURE (REVIEW OF LITERATURE)

Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia

Neopterin is a purine nucleotide produced in response to inflammatory responses. In any condition associated with the activation of the immune response and inflammation, the level of neopterin is significantly increased. Since the pathophysiological aspects of heart failure involve inflammatory reactions, it is logical that neopterin levels should be high in patients with this pathology. The purpose of the presented literature review is to consider neopterin as a new marker in heart failure. Studies conducted to date on neopterin indicate the potentially important diagnostic and prognostic value of assessing this marker in patients with heart failure. Further scientific and clinical studies may demonstrate even more convincing prospects for the use of neopterin as an additional laboratory tool for the diagnosis, risk stratification and prediction of adverse cardiovascular events in patients with heart failure. Determination of neopterin concentrations to assess the effectiveness of drug therapy in heart failure remains to be further studied to draw a final conclusion.

Key words: cardiovascular disease; inflammation; biological markers; neopterin; review.

For citation: Alieva A.M., Teplova N.V., Baykova I.E., Kotikova I.A., Nikitin I.G. Neopterin as a cardiovascular biological marker in heart failure (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 203-209 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-203-209>

For correspondence: Alieva Amina Magomedovna, M.D., Associate Professor of the department of Hospital Therapy named after academician G.I. Storozhakov; e-mail: amisha_alieva@mail.ru

Information about authors:

Alieva A.M., <https://orcid.org/0000-0001-5416-8579>;

Teplova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7181-4680>;

Baykova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-0886-6290>;

Kotikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5352-8499>;

Nikitin I.G., <https://orcid.org/0000-0003-1699-0881>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 18.02.2023

Accepted 28.02.2023

Published 00.04.2023

Введение. Сердечная недостаточность (СН) в течение нескольких десятилетий превратилась в глобальную медицинскую, социальную и экономическую проблему [1-4]. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) – это синдром, обусловленный дисбалансом нейрогуморальной регуляции сердечно-сосудистой системы, который сопровождается нарушением систолической и/или диастолической функции сердца и проявляется застоем по большому и/или малому кругу кровообращения [1, 2]. Причинами развития СН являются многие сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ): артериальная гипертензия (АГ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), клапанные пороки сердца, воспалительные, аутоиммунные и наследственные патологии миокарда [1, 2]. Изменение архитектоники, приводящее к дилатации сердечных полостей, снижению растяжимости кардиомиоцитов (КМЦ) с уменьшением подвижности стенок левого желудочка (ЛЖ), задержка жидкости, вазоконстрикция, ремоделирование сосудов с увеличением постнагрузки, активация нейрогуморальных механизмов представляют собой порочный замкнутый круг патогенеза застойной недостаточности кровообращения [1, 2].

Воспаление – это универсальная реакция организма на различные повреждающие факторы, направленная на восстановление целостности тканей и снижение гибели клеток. У пациентов с сердечной недостаточностью воспалительные реакции приводят к повреждению кардиомиоцитов, их апоптозу и активации нейрогуморальных систем, которые способствуют запуску гибернации миокарда и механизмов его ремоделирования [5, 6]. Неоптерин – пуриновый нуклеотид, продуцируемый в ответ на воспалительные реакции. При любом состоянии, связанном с активацией иммунного ответа и воспалением, уровень неоптерина значительно повышается [7-9]. Поскольку патофизиологические аспекты сердечной недостаточности включают воспалительные реакции, логично, что уровни неоптерина должны быть высокими у пациентов с данной патологией. Цель представленного обзора литературы – рассмотреть неоптерин в качестве нового маркера при сердечной недостаточности.

Стратегия поиска. В статье представлен анализ литературных данных о роли неоптерина как биологического маркера при кардиоваскулярной патологии. Мы провели анализ литературных источников, включавший все релевантные публикации до 17.02.23 г., в базе данных российского научного индекса цитирования (РИНЦ), а также в зарубежных базах (PubMed, MedLine, Google Scholar, Science Direct). При поиске статей использовали следующие ключевые слова и их комбинации: биологические маркеры, сердце, сердечно-сосудистые заболевания, неоптерин, biological markers, heart, cardiovascular diseases, neopterin. Списки литературы из определенных статей были также просмотрены для выявления дополнительных релевантных ссылок.

Биосинтез неоптерина. Неоптерин, пирозино-пиримидиновое соединение, имеет молекулярную массу 253 Да [8, 10, 11]. A. Sakurai и M.

Goto [8, 10] впервые выделили неоптерин из мочи человека в 1967 году. Неоптерин синтезируется моноцитами и макрофагами в ответ на стимуляцию интерфероном- γ (IFN- γ) [11, 12]. Любое состояние, приводящее к выработке и активации IFN- γ , может индуцировать синтез неоптерина [8, 11, 12]. Гуанозинтрифосфат (ГТФ, GTP)-циклогидролаза является одним из ферментов, регулируемых IFN- γ . Этот фермент катализирует распад ГТФ до 7,8-дигидронеоптеринатрифосфата. 7,8-дигидронеоптерин диффундирует из активированных макрофагов во внутриклеточные пространства и, наконец, в плазму. Часть 7,8-дигидронеоптерина окисляется до высокофлуоресцентного неоптерина [11, 12]. Высвобождение 7,8-дигидронеоптерина и неоптерина специфично для моноцитов, макрофагов и дендритных клеток и в меньшей степени для эпителиальных клеток [8, 11]. Далее представлено схематическое изображение синтеза неоптерина (рис. 1).

Неоптерин в качестве биологического маркера при кардиологических и некардиологических заболеваниях. Повышение уровня неоптерина установлено при воспалительных, иммунных и дегенеративных заболеваниях (пародонтите, воспалительных заболеваниях кишечника, неалкогольной жировой болезни печени, легочном саркоидозе, интерстициальных заболеваниях легких, хронических заболеваниях почек, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, дерматомиозите, синдроме Шегрена и болезни Альцгеймера [8, 11, 17 - 21]. Циркулирующие концентрации неоптерина также повышены у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2), дислипидемией, ожирением, метаболическим синдромом (МС), системной и легочной гипертензией, нарушением дыхания во сне, преэклампсией и болезнью Кавасаки [8, 11, 22 - 25]. Неоптерин экспрессируется в пенистых клетках атероматозных бляшек аорты, сонных артерий (СА) и коронарных артерий (КА) [26, 27]. 7,8-дигидронеоптерин также присутствует в атеросклеротических бляшках, но значительно меньше, чем неоптерин [28]. По сравнению с неоптеринем 7,8-дигидронеоптерин химически нестабилен и легко разлагается из-за окисления, поэтому не подходит для рутинных лабораторных диагностических измерений [11]. Период полувыведения неоптерина составляет 90 минут [11]. Средние концентрации в крови человека составляют примерно $5,2 \pm 2,5$ нмоль/л [11]. Уровни неоптерина в сыворотке и плазме не различаются [11]. Для оценки маркера используют иммуноферментный анализ (ИФА) для количественного определения неоптерина в плазме, сыворотке крови и в моче.

Люди с ожирением имеют более высокие уровни неоптерина. Данный маркер может быть потенциальным фактором риска развития ИБС при ожирении [29]. Отмечено повышение неоптерина у пациентов с инсулинорезистентностью (ИР) и сахарным диабетом (СД) [30]. Концентрации неоптерина в крови пациентов с заболеваниями сонных, церебральных, периферических артерий, с аневризмой аорты выше, по сравнению со здоровыми людьми [11, 33–34]. Уста-

новлена положительная связь неоптерина с наличием и тяжестью ИБС [35, 36]. Утяжеление ИБС связано с повышением концентрации неоптерина. [37]. Отмечено значимое повышение уровня неоптерина при остром инфаркте миокарда (ОИМ) [38]. Высокая концентрация неоптерина является независимым маркером дисфункции левого желудочка (ЛЖ) и его ремоделирования [39, 40], а также предиктором неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС [41]. Далее представлены уровни неоптерина при ряде заболеваний (см. таблицу).

Клинические исследования, посвящённые изучению неоптерина при сердечной недостаточности.

К настоящему времени имеется небольшое количество работ, посвященных изучению неоптерина у пациентов с сердечной недостаточностью [45]. Еще в 1993 году С. Wiedermann и соавт. [46] анализировали уровни сывороточного неоптерина у 16 пациентов с СН и у 11 здоровых добровольцев. Исследователи обнаружили, что уровни неоптерина были статистически достоверно выше у пациентов с сердечной недостаточностью по сравнению со здоровыми людьми.

Т. Sasaki и соавт. [47] определяли концентрацию неоптерина в сыворотке крови у 198 пациентов с ХСН (контрольная группа – 62 человека). Пациентов про-

спективно наблюдали в среднем в течение 745 дней. Концентрация неоптерина в сыворотке увеличивалась с повышением ФК СН согласно классификации NYHA (классификация выраженности ХСН Нью-Йоркской кардиологической ассоциации ($p < 0,001$)). В группе больных с высоким содержанием неоптерина частота неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (ССС) была значительно выше, чем в группе с низким содержанием неоптерина ($p < 0,0001$). В многофакторном анализе Кокса концентрация неоптерина в сыворотке крови была независимым фактором риска неблагоприятных ССС (отношение рисков (ОР) 1,70, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,16-2,50, $p = 0,0068$).

I. Wietlicka-Kokoszaneck и соавт. [48] определяли концентрации неоптерина у 47 пациентов с II и III функциональным классом (ФК) сердечной недостаточности по NYHA (классификация выраженности ХСН Нью-Йоркской кардиологической ассоциации) и у 20 здоровых людей. Результаты исследования продемонстрировали значительно более высокие концентрации неоптерина в группе больных, чем в контрольной группе.

Целью исследования S. Demir и соавт. [49] явилось изучение уровней неоптерина в крови пациентов с си-

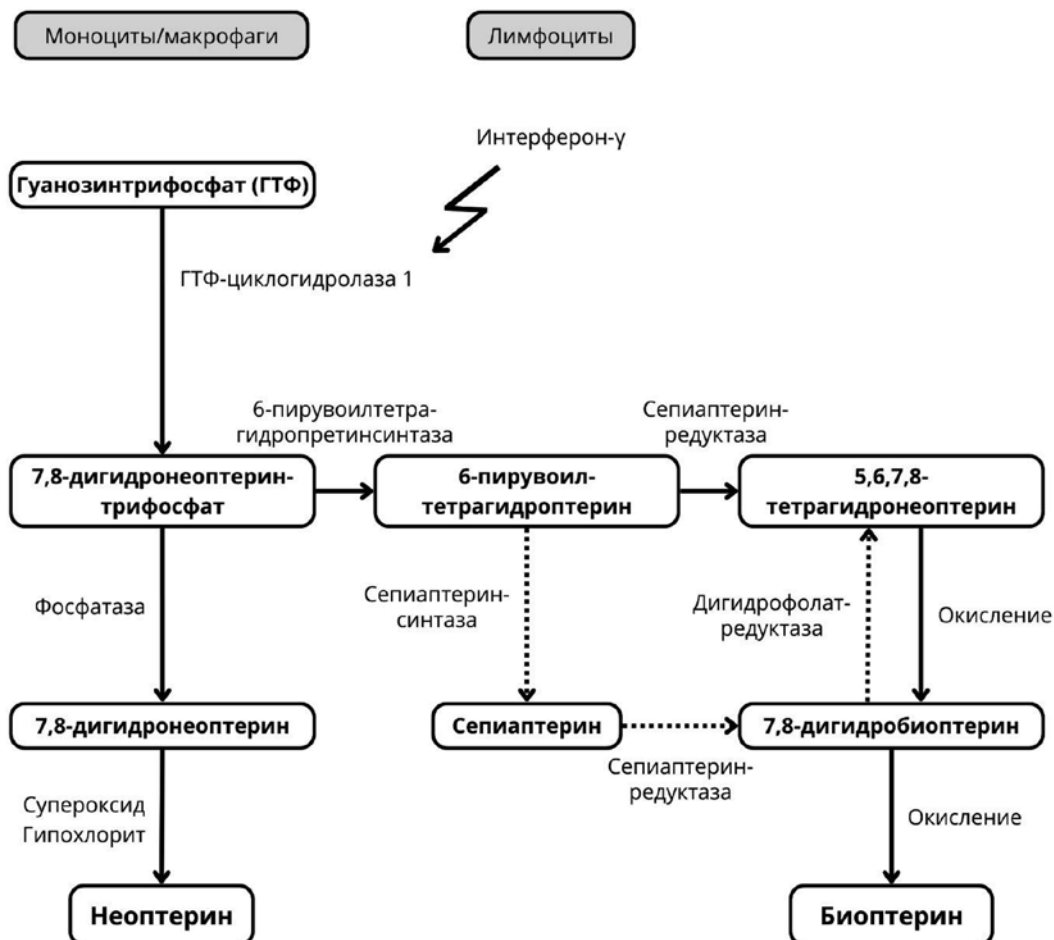


Рис. 1. Биосинтез неоптерина.

Концентрации неоптерина в крови при ряде заболеваний

Показатели	Заболевание	Контроль	p-уровень значимости	Авторы
Сахарный диабет	2,7±1,1 ↑	2,2±1,0	<0,05	J. Lee и соавт. [22]
Атеросклероз сонных артерий (мужчины)	8,5±2,7 ↑	6,7±2,3	<0,0001	G. Weiss и соавт. [42]
Атеросклероз сонных артерий (женщины)	9,6±3,3 ↑	7,5±2,3	<0,0001	G. Weiss и соавт. [42]
Ишемический инсульт	16,0±3,8 ↑	1,3±0,2	=0,001	A. Tony и соавт. [32]
Ишемическая болезнь сердца	12,3±1,0 ↑	9,7±0,6	<0,05	Shirai R. и соавт. [27]
Стабильная стенокардия напряжения	8,6±2,2 ↑	6,8±1,8	<0,0001	M. Schumacher и соавт. [36]
Инфаркт миокарда	13,7±3,4 ↑	6,8±1,8	<0,0001	M. Schumacher и соавт. [36]
Сердечно-сосудистые события	22,9±13,2 ↑	14,6±6,3	<0,001	T. Yoshiyama и соавт. [43]
Сердечная недостаточность	51,5 (43,6-57,2) ↑	37,2 (30,6-46,1)	<0,001	E. Yamamoto и соавт. [44]
Дилатационная кардиомиопатия	5,78 (3,27-12,5) ↑	4,99 (2,66-8,28)	НД	C. Wojciechowska и соавт. [52]

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка/отклонение или медиана и диапазон. Стрелками показаны изменения уровня неоптерина по сравнению с контролем. НД – нет данных.

столической СН (81 больной с СН и 81 здоровый человек того же возраста и пола (контрольная группа)). Пациентов наблюдали в течение 1-го года. Среднее значение неоптерина в группе СН было значительно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). Уровни высокочувствительного С-реактивного белка (вСРБ, hsCRP) и предшественника мозгового натрийуретического пептида (proBNP) прямо коррелировали с уровнями неоптерина ($p = 0,667$ и $0,778$ соответственно). Выявлена достоверная корреляция между числом госпитализаций и уровнем неоптерина среди пациентов с СН ($p = 0,008$). В группе СН значение неоптерина у умерших в течение 1 года пациентов ($n = 29$) было выше, чем у выживших ($n = 52$) ($p = 0,011$).

Е. Yamamoto и соавт. [44] изучили клиническое значение неоптерина у 68 пациентов с СН с сохраненной фракцией выброса левого желудочка (СНсФВ). Уровни неоптерина в плазме крови достоверно повышались при СНсФВ и коррелировали с тяжестью СН. Кроме того, высокий уровень неоптерина был связан с будущими неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями, что указывает на то, что измерение данного маркера может обладать клиническими преимуществами для стратификации риска у пациентов с СНсФВ.

L. Lanser и соавт. [50] определяли уровни неоптерина у 149 пациентов с СН. Пациенты наблюдались в среднем 58 месяцев. Концентрации неоптерина коррелировали с концентрациями N-концевого фрагмента натрийуретического пептида (NT-proBNP) ($r_s = 0,399$, $p < 0,001$) и функциональным классом СН согласно классификации NYHA (I: 5,60 нмоль/л; II: 6,90 нмоль/л; III/IV: 7,80 нмоль/л, $p = 0,033$). Более высокие уровни неоптерина были прогностическими факторами неблагоприятного исхода (смерть или госпитализация в связи с декомпенсацией СН) независимо от возраста и пола, а также от установленных показателей СН, таких как ФК NYHA, NT-proBNP, расчетная скорость клубочковой фильтрации (pСКФ) и ФВ ЛЖ (ОР 2,770; 95% ДИ 1,419-5,407; $p = 0,003$). Пациенты с показателем неоптерин/pСКФ $\geq 0,133$ имели более чем восьмикратный повышенный риск

достижения конечной точки по сравнению с пациентами с отношением неоптерин/pСКФ $\leq 0,065$ (ОР 8,380; 95% ДИ 2,889-24,308; $p < 0,001$). Таким образом, авторы установили, что при сердечной недостаточности концентрации неоптерина увеличиваются по мере утяжеления состояния; высокие уровни неоптерина предсказывают плохой прогноз у пациентов с сердечной недостаточностью.

К. Berg и соавт. [51] проспективно проанализировали образцы крови и клинические данные 1018 пациентов, перенесших операцию на сердце с 1 апреля 2008 г. по 19 апреля 2010 года. Конечной точкой исследования была послеоперационная сердечная дисфункция, определяемая как потребность в более чем одном инотропном препарате или внутриаортальной баллонной контрпульсации. Неоптерин был достоверно связан с послеоперационной сердечной дисфункцией: отношение шансов (ОШ) 2,73, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,65-4,51 после поправки на клинические переменные. Авторы пришли к выводу, что неоптерин ассоциировался с сердечной дисфункцией после операции на сердце и повышал точность прогнозирования риска послеоперационной сердечной дисфункции.

Работа С. Wojciechowska и соавт. [52] была посвящена изучению неоптерина у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП). Неоптерин в сыроворотке крови определяли у 172 пациентов с ДКМП неишемического генеза, перенесших эндомиокардиальную биопсию правого желудочка, и у 30 здоровых добровольцев. Уровень неоптерина был повышен у пациентов с ДКМП по сравнению со здоровым контролем (8,11 (4,50-12,57) и 4,99 (2,66-8,28) нмоль/л соответственно ($p < 0,05$)). Неоптерин положительно коррелировал с количеством макрофагов в биоптатах ($p < 0,05$), концентрацией CRP ($p < 0,05$), фибриногена ($p < 0,01$) и ФК NYHA ($p < 0,05$) и отрицательно с ФВ ЛЖ ($p < 0,05$). Можно сделать предварительный вывод, что концентрация неоптерина отражает иммунный ответ в биоптатах. Кроме того, неоптерин коррелирует с белками острой фазы и стадией сердечной недостаточности и, по всей видимости, указывает на

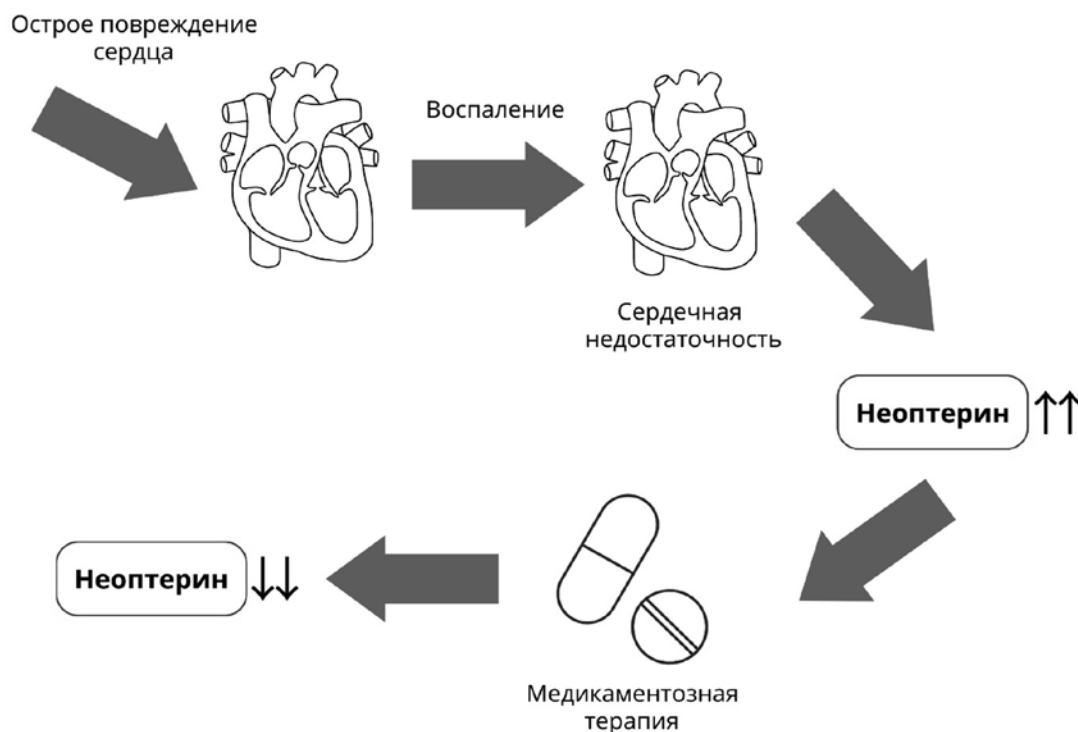


Рис. 2. Роль неоптерина при сердечной недостаточности.

общую иммунную и воспалительную активацию при данной патологии.

Таким образом, учитывая результаты вышеперечисленных исследований, на сегодняшний день мы имеем убедительные доказательства надежности использования неоптерина в качестве диагностического и прогностического биомаркера при сердечной недостаточности (рис. 2).

G. Dogheim и соавт. [53] оценивали влияние ивабрадина на уровни NT-proBNP и неоптерина у пациентов с сердечной недостаточностью. 60 пациентов, получавших стандартную терапию СН, были случайным образом распределены на подгруппу пациентов, получающих ивабрадин ($n=30$, 1-я подгруппа), и подгруппу, не получающих ивабрадин ($n=30$, 2-я подгруппа). Ивабрадин по 5 мг 2 раза в сутки назначался в течение 3 месяцев. В 1-й подгруппе наблюдалось достоверное уменьшение ФК СН согласно классификации NYHA ($p<0,001$). ФВ ЛЖ улучшилась в обеих подгруппах ($p<0,001$) с большим улучшением в 1-й подгруппе ($p=0,026$). Концентрации NT-proBNP и неоптерина значительно снизились в 1-й подгруппе (NT-proBNP: $p<0,001$; неоптерин: $p<0,001$). Выявлена достоверная положительная корреляция между частотой сердечных сокращений и уровнями биомаркеров после назначения ивабрадина (NT-proBNP: $r=0,475$, $p<0,001$, неоптерин: $r=0,384$, $p=0,002$). Таким образом, согласно полученным данным, неоптерин может служить лабораторным инструментом для оценки эффективности ивабрадина при СН. Однако следует отметить, что данное исследование проводилось только в течение 3-х месяцев, а размер выборки был довольно

маленьким. В связи с этим следует провести дальнейшие исследования для оценки влияния стратегий лечения СН на уровни неоптерина [53] (см. рис. 2).

Заключение. Исследования в области изучения новых биологических маркеров должны помочь в ранней диагностике и подборе более эффективной терапии пациентов кардиологического профиля. Анализ лабораторных биологических маркеров основательно занял свою нишу в онкологии, однако применение их в области сердечно-сосудистых заболеваний пребывает в состоянии начального становления. В настоящее время имеются доступные современные технологии для идентификации новых биомаркеров, вследствие чего целесообразна разработка мультибиомаркерной модели диагностики и прогнозирования течения сердечно-сосудистых заболеваний. Проведенные к настоящему времени исследования, посвященные неоптерину, указывают на потенциально важную диагностическую и прогностическую значимость оценки данного маркера у пациентов с сердечной недостаточностью. Дальнейшие научно-клинические исследования, возможно, продемонстрируют еще более убедительные перспективы использования неоптерина в качестве дополнительного лабораторного инструмента для диагностики, стратификации риска и прогнозирования неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с сердечной недостаточностью. Определение концентраций неоптерина для оценки эффективности лекарственной терапии при сердечной недостаточности еще предстоит дополнительно изучить, чтобы сделать окончательный вывод.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-44, 46-53 см. REFERENCES)

45. Алиева А.М., Пинчук Т.В., Воронкова К.В., Шнахова Л.М., Эттингер О.А., Ахмедова М.Ф. и др. Неоптерин – биомаркер хронической сердечной недостаточности (обзор современной литературы). *Consilium Medicum*. 2021; 23 (10): 756-9. DOI: 10.26442/20751753.2021.10.201113.

REFERENCES

1. Heidenreich P.A., Bozkurt B., Aguilar D., Allen L.A., Byun J.J., Colvin M.M. et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2022; 145 (18): e876-e894. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001062.

2. Chen J., Aronowitz P. Congestive Heart Failure. *Med. Clin. North Am.* 2022; 106(3): 447-58. DOI: 10.1016/j.mcna.2021.12.002.

3. Emmons-Bell S., Johnson C., Roth G. Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review. *Heart*. 2022; 108 (17): 1351-60. DOI: 10.1136/heartjnl-2021-320131.

4. Savarese G., Becher P.M., Lund L.H., Seferovic P., Rosano G.M.C. et al. Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology. *Cardiovasc. Res.* 2023; 118 (17): 3272-87. DOI: 10.1093/cvr/cvac013.

5. Paraskevaidis I., Farmakis D., Papingiotis G., Tsougos E. Inflammation and Heart Failure: Searching for the Enemy- Reaching the Entelechy. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2023; 10 (1): 19. DOI: 10.3390/jcdd10010019.

6. Halade G.V., Lee D.H. Inflammation and resolution signaling in cardiac repair and heart failure. *EBioMedicine*. 2022; 79: 103992. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103992.

7. Tezcan D., Onmaz D.E., Sivrikaya A., Hakbilen S., Korez M.K., Gulcemal S. et al. Assessment of serum neopterin and calprotectin as biomarkers for subclinical inflammation in patients with familial Mediterranean fever. *Ir. J. Med. Sci.* 2022; 1–8. DOI: 10.1007/s11845-022-03173-w.

8. Dogheim G.M., Amralla M.T., Werida R.H. Role of neopterin as an inflammatory biomarker in congestive heart failure with insights on effect of drug therapies on its level. *Inflammopharmacology*. 2022; 30 (5): 1617-22. DOI: 10.1007/s10787-022-01028-5.

9. Middtun O., Ulvik A., Meyer K., Zahed H., Giles G.G., Manjer J. et al. A cross-sectional study of inflammatory markers as determinants of circulating kynurenines in the Lung Cancer Cohort Consortium. *Sci. Rep.* 2023; 13 (1): 1011. DOI: 10.1038/s41598-023-28135-9.

10. Sakurai A., Goto M. Neopterin: isolation from human urine. *J. Biochem.* 1967; 61 (1): 142-5. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128513.

11. Watanabe T. Neopterin derivatives - a novel therapeutic target rather than biomarker for atherosclerosis and related diseases. *Vasa*. 2021; 50 (3): 165-73. DOI: 10.1024/0301-1526/a000903.

12. Gieseg S.P., Baxter-Parker G., Lindsay A. Neopterin, Inflammation, and Oxidative Stress: What Could We Be Missing? *Antioxidants* (Basel). 2018; 7 (7): 80. DOI: 10.3390/antiox7070080.

13. Moens A.L., Kass D.A. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26 (11): 2439-44. DOI: 10.1161/01.ATV.0000243924.00970.cb.

14. Baxter-Parker G., Prebble H.M., Cross S., Steyn N., Shchepetkina A., Hock B.D. et al. Neopterin formation through radical scavenging of superoxide by the macrophage synthesised antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Free Radic. Biol. Med.* 2020; 152: 142-51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.002.

15. Bendall J.K., Douglas G., McNeill E., Channon K.M., Crabtree M.J. Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014; 20 (18): 3040-77. DOI: 10.1089/ars.2013.5566.

16. Cunningham C., Van Assche T., Shirodaria C., Kylintireas I., Lindsay A.C., Lee J.M. et al. Systemic and vascular oxidation limits the efficacy of oral tetrahydrobiopterin treatment in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2012; 125 (11): 1356-66. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.038919.

17. Prasanna J.S., Sumadhura C., Karunakar P. Neopterin as a diagnostic biomarker for diagnosis of inflammatory diseases like periodontitis. *J. Oral. Res. Rev.* 2017; 9: 45-9.

18. Peng Q.L., Zhang Y.M., Liang L., Liu X., Ye L.F., Yang H.B. et al. A high level of serum neopterin is associated with rapidly progressive interstitial lung disease and reduced survival in dermatomyositis. *Clin. Exp. Immunol.* 2020; 199 (3): 314-25. DOI: 10.1111/cei.13404.

19. Labouret M., Costi S., Bondet V., Trebossen V., Le Roux E., Ntorkou A. et al. Juvenile Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus: Identification of Novel Central Neuroinflammation Biomarkers. *J. Clin. Immunol.* 2023; 43(3):615-24. DOI: 10.1007/s10875-022-01407-1. DOI: 10.1007/s10875-022-01407-1.

20. Videm V., Houge I.S., Liff M.H., Hoff M. Inflammation mediates approximately one quarter of excess relative all-cause mortality in persons with rheumatoid arthritis: the Trondelag Health Study. *Sci. Rep.* 2022; 12 (1): 18599. DOI: 10.1038/s41598-022-21977-9.

21. Heneberk O., Vernerova A., Kujovska Krcmova L., Wurfelova E., Radochova V. Neopterin levels in periodontitis and after nonsurgical periodontal therapy: evaluation of gingival crevicular fluid, oral fluid, serum and urinary samples-A case-control study. *Biomedicines*. 2022; 10 (12): 3200. DOI: 10.3390/biomedicines10123200.

22. Lee J.E., Oh T.J., Moon J.H., Park K.S., Jang H.C., Choi S.H. Serum Neopterin Concentration and Impaired Glucose Metabolism: Relationship With β -Cell Function and Insulin Resistance. *Front Endocrinol.* (Lausanne). 2019; 10: 43. DOI: 10.3389/fendo.2019.00043.

23. Smukowska-Gorynia A., Marcinkowska J., Chmara E., Malaczynska-Rajpold K., Slawek-Szmyt S., Cieslewicz A. et al. Neopterin as a Biomarker in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Respiration*. 2018; 96 (3): 222-30. DOI: 10.1159/000488908.

24. Pergialiotis V., Karampetsou N., Zoumpourlis P., Papantoniou N., Thomakos N., Daskalakis G. Serum neopterin levels in women with preeclampsia: a systematic review. *Hypertens Pregnancy*. 2018; 37 (4): 220-6. DOI: 10.1080/10641955.2018.1526300.

25. Jinkawa A., Shimizu M., Nishida K., Kaneko S., Usami M., Sakumura N. et al. Cytokine profile of macrophage activation syndrome associated with Kawasaki disease. *Cytokine*. 2019; 119: 52-6. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.03.001.

26. van Dijk R.A., Rijs K., Wezel A., Hamming J.F., Kolodgie F.D., Virmani R. et al. Systematic evaluation of the cellular innate immune response during the process of human atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5 (6): e002860. DOI: 10.1161/JAHA.115.002860.

27. Shirai R., Sato K., Yamashita T., Yamaguchi M., Okano T., Watanabe-Kominato K. et al. Neopterin counters vascular inflammation and atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7 (3): e007359. DOI: 10.1161/JAHA.117.007359.

28. Janmale T., Genet R., Crone E., Flavall E., Firth C., John Pirker J. et al. Neopterin and 7,8-dihydroneopterin are generated within atherosclerotic plaque. *Pteridines*. 2015; 26:93-103.

29. Avci E., Karabulut A., Alp A.G., Baba B., Bilgi C. Crucial markers showing the risk of coronary artery disease in obesity: ADMA and neopterin. *J. Med. Biochem.* 2020; 39 (4): 452-9. DOI: 10.5937/jomb0-24683.

30. Lee J.E., Oh T.J., Moon J.H., Park K.S., Jang H.C., Choi S.H. Serum Neopterin Concentration and Impaired Glucose Metabolism: Relationship With β -Cell Function and Insulin Resistance. *Front Endocrinol.* (Lausanne). 2019; 10: 43. DOI: 10.3389/fendo.2019.00043.

31. Sugioka K., Naruko T., Hozumi T., Nakagawa M., Kitabayashi C., Ikura Y. et al. Elevated levels of neopterin are associated with carotid plaques with complex morphology in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis*. 2010; 208 (2): 524-30. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.054.

32. Tony A.A., Tony E.A., Mohammed W.S., Kholef E.F. Evaluation of plasma levels of neopterin and soluble CD40 ligand in patients with acute ischemic stroke in upper Egypt: can they surrogate the severity and functional outcome? *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2019; 15: 575-86. DOI: 10.2147/NDT.S177726.

33. Odegard A., Aasland J., Myhre H.O., Mollnes T.E., Videm V. The inflammatory response to stent grafting of the thoracic aorta. *Int. Angiol.* 2007; 26: 219-27.

34. Ceasovschiu A., Sorodoc V., Onofrei Aursulesei V., Tesloianu D., Tuchilus C., Anisie E. et al. Biomarker Utility for Peripheral Artery Disease Diagnosis in Real Clinical Practice: A Prospective Study. *Diagnostics* (Basel). 2020; 10 (9): 723. DOI: 10.3390/diagnostics10090723.
35. Tanaka T., Nakamura Y., Nasuno A., Mezaki T., Higuchi K., Fukunaga H. et al. Plasma concentrations of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and neopterin in the coronary circulation of patients with coronary artery disease. *Circ. J.* 2004; 68 (2): 114-20. DOI: 10.1253/circj.68.114.
36. Schumacher M., Halwachs G., Tatzber F., Fruhwald F.M., Zweiker R., Watzinger N. et al. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997; 30 (3): 703-7. DOI: 10.1016/s0735-1097(97)00172-1.
37. Zouridakis E., Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Fredericks S., Kaski J.C. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation.* 2004; 110 (13): 1747-53. DOI: 10.1161/01.CIR.0000142664.18739.92.
38. Liu Z.Y., Li Y.D. Relationship between serum neopterin levels and coronary heart disease. *Genet. Mol. Res.* 2013; 12 (4): 4222-9. DOI: 10.4238/2013.
39. Estevez-Loureiro R., Recio-Mayoral A., Sieira-Rodriguez-Moret J.A., Trallero-Araguas E., Kaski J.C. Neopterin levels and left ventricular dysfunction in patients with chronic stable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 2009; 207 (2): 514-8. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.032.
40. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Avanzas P., Laynez-Cerdena I., Kaski J.C. Neopterin predicts left ventricular remodeling in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis.* 2010; 211 (2): 574-8. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.017.
41. Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Quiles J., Roy D., Kaski J.C. Elevated serum neopterin predicts future adverse cardiac events in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur. Heart J.* 2005; 26 (5): 457-63. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi111.
42. Weiss G., Willeit J., Kiechl S., Fuchs D., Jarosch E., Oberholzenzer F. et al. Increased concentrations of neopterin in carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1994; 106 (2): 263-71. DOI: 10.1016/0021-9150(94)90131-7.
43. Yoshiyama T., Sugioka K., Naruko T., Nakagawa M., Shirai N., Ohsawa M. et al. Neopterin and Cardiovascular Events Following Coronary Stent Implantation in Patients with Stable Angina Pectoris. *J. Atheroscler. Thromb.* 2018; 25 (11): 1105-17. DOI: 10.5551/jat.43166.
44. Yamamoto E., Hirata Y., Tokitsu T., Kusaka H., Tabata N., Tsujita K. et al. The clinical significance of plasma neopterin in heart failure with preserved left ventricular ejection fraction. *ESC Heart Fail.* 2016; 3 (1): 53-9. DOI: 10.1002/ehf2.12070.
45. Alieva A.M., Pinchuk T.V., Voronkova K.V., Shnakhova L.M., Etinger O.A., Akhmedova M.F. et al. Neopterin as a biomarker of chronic heart failure (review of modern literature). *Consilium Medicum.* 2021; 23(10): 756-9. DOI: 10.26442/20751753.2021.10.201113. (in Russian)
46. Wiedermann C.J., Beimpold H., Herold M., Knapp E., Braunsteiner H. Increased levels of serum neopterin and decreased production of neutrophil superoxide anions in chronic heart failure with elevated levels of tumor necrosis factor-alpha. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993; 22 (7): 1897-1901. DOI: 10.1016/0735-1097(93)90776-w.
47. Sasaki T., Takeishi Y., Suzuki S., Niizeki T., Kitahara T., Katoh S. et al. High serum level of neopterin is a risk factor of patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* 2010; 145 (2): 318. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.11.042.
48. Wietlicka-Kokoszane I., Jablecka A., Smolarek I., Bogdanski P., Chmara E., Korzeniowska K. et al. Neopterin as a prognostic marker in patients with chronic heart failure. *Med. Sci. Monit.* 2010; 16 (5): CR232-CR237.
49. Demir S., Ede H., Kaplan M., Yavuz F., Yucel C., Kurt I.H. Neopterin as a novel marker; well correlated with mortality and morbidity in patients with advanced systolic heart failure. *Acta Cardiol.* 2019; 74 (3): 216-21. DOI: 10.1080/00015385.2018.1478266.
50. Lanser L., Polzl G., Fuchs D., Weiss G., Kurz K. Neopterin is associated with disease severity and outcome in patients with non-ischaemic heart failure. *J. Clin. Med.* 2019; 8 (12): 2230. DOI: 10.3390/jcm8122230.
51. Berg K.S., Stenseth R., Pleym H., Wahba A., Videm V. Neopterin predicts cardiac dysfunction following cardiac surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2015; 21 (5): 598-603. DOI: 10.1093/icvts/ivv219.
52. Wojciechowska C., Wodniecki J., Wojnicz R., Romuk E., Jachec W., Tomasik A. et al. Neopterin and beta-2 microglobulin relations to immunity and inflammatory status in nonischemic dilated cardiomyopathy patients. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 585067. DOI: 10.1155/2014/585067.
53. Dogheim G.M., Khairat I., Omran G.A., El-Haggag S.M., Amrawy A.M.E., Werida R.H. Clinical comparative study assessing the effect of ivabradine on neopterin and NT-Pro BNP against standard treatment in chronic heart failure patients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2022; 78 (6): 943-54. DOI: 10.1007/s00228-022-03290-6.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Амхадова М.А.¹, Петрухина Н.Б.², Сандлер И.В.¹, Салтовец М.В.³, Поляков В.М.⁴, Демидова А.А.⁴, Пилипенко К.Д.⁴

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СОСТАВА И КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД ПОЛОСТИ РТА У ПАЦИЕНТОВ С ПАРОДОНТИТОМ ПОСЛЕ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия;

³Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО Волгоградский ГМУ Минздрава РФ, 357532, Пятигорск, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия

Целью работы явилось выявить особенности цитокинового состава слюнной жидкости и маркера костного метаболизма в смешанной слюне у пациентов с обострением хронического генерализованного пародонтита (ХГП) после перенесенной коронавирусной инфекции с учетом наличия и разновидности иммуносупрессивной терапии. Обследованы 108 больных основной группы с диагнозом ХГП средней тяжести в фазе обострения после перенесенного COVID-19 с длительностью постковидного этапа 3-6 месяцев. 1-я группа сравнения включала 71 пациента с диагнозом ХГП средней тяжести в фазе обострения без коронавирусного заболевания в анамнезе. Во 2-й группе сравнения были 33 пациента с перенесенным COVID-19 за 3-6 месяцев до начала исследования. Контрольную группу составили 32 здоровых добровольца. Методом иммуноферментного анализа в смешанной слюне определяли концентрацию костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ), в экссудате пародонтальных карманов (ПК) содержание интерлейкина-6 (ИЛ-6) и трансформирующего фактора роста- $\beta 1$ (ТФР- $\beta 1$). У пациентов основной группы концентрация ИЛ-6 в содержимом ПК возросла по отношению к контролю в 38 раз ($p < 0,001$) и превышала уровень исследуемого цитокина в двух группах сравнения. При использовании в лечении COVID-19 дексаметазона на фоне снижения ИЛ-6 в пародонтальном экссудате наблюдалась выраженная активация костного метаболизма с повышением КЩФ в смешанной слюне. Эффективное угнетение иммуновоспалительных реакций в полости рта наблюдалось при использовании в лечении COVID-19 ингибиторов сигнального пути JAK-STAT. Применение у больных COVID-19 антагонистов к рецепторам ИЛ-6 сопровождалось снижением активности остеодеструктивных процессов. При отсутствии иммуносупрессивной терапии при лечении COVID-19 наблюдались резкое повышение ИЛ-6 и ТФР- $\beta 1$ в пародонтальном экссудате, активация костного метаболизма, что способствовало обострению ХГП на постковидном этапе. Итак, при обострении ХГП после перенесенного COVID-19 цитокиновый состав содержимого ПК и особенности костного метаболизма в полости рта зависели от наличия и вида используемой иммуносупрессивной терапии.

Ключевые слова: хронический генерализованный пародонтит; новая коронавирусная инфекция; иммуносупрессивная терапия; цитокины.

Для цитирования: Амхадова М.А., Петрухина Н.Б., Сандлер И.В., Салтовец М.В., Поляков В.М., Демидова А.А., Пилипенко К.Д. Особенности цитокинового состава и костного метаболизма биологических сред полости рта у пациентов с пародонтитом после коронавирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 210-214. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-210-214>

Для корреспонденции: Демидова Александра Александровна, д-р мед. наук, доц., зав. кафедрой медицинской и биологической физики; e-mail: alald@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.02.2023

Принята к печати 22.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

Amhadova M.A.¹, Petrukhina N.B.², Sandler I.V.¹, Saltovets M.V.³, Polyakov V.M.⁴, Demidova A.A.⁴, Pilipenko K.D.⁴

FEATURES OF THE CYTOKINE COMPOSITION AND BONE METABOLISM OF THE BIOLOGICAL MEDIA OF THE ORAL CAVITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS AFTER CORONAVIRUS INFECTION

¹Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirsky, 129110, Moscow, Russia;

²"First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov" of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia;

³Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – Branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 357500, Pyatigorsk, Russia;

⁴Rostov State Medical University, 344022, Rostov-on-Don, Russia

The aim of the work was to identify the features of the cytokine composition of the gingival fluid and the marker of bone metabolism in mixed saliva in patients with exacerbation of chronic generalized periodontitis (CGP) after a coronavirus infection, taking into account the presence and type of immunosuppressive therapy. We examined 108 patients of the main group diagnosed with CGP of moderate severity in the exacerbation phase after suffering COVID-19 with a duration of the post-COVID stage of 3-6 months. Comparison group 1 included 71 patients diagnosed with moderate CGP in the exacerbation phase without a history of coronavirus disease. Comparison group 2 was formed from 33 patients with COVID-19 3-6 months before the start of the study. The control group consisted of 32 healthy volunteers. ELISA was used to determine the concentration of bone isoenzyme of alkaline phosphatase (ALP) in mixed saliva, and the content of interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in the exudate of periodontal pockets (PC). In patients of the main group, the concentration of IL-6 in the contents of PC increased in relation to the control by 38 times ($p < 0,001$) and exceeded the level of the studied cytokine in the two comparison groups. When dexamethasone was used in the treatment of COVID-19, against the background of a decrease in IL-6 in periodontal exudate, a pronounced activation of bone metabolism was observed with an increase in ALP in mixed saliva. Effective inhibition of immune-inflammatory responses in the oral cavity was observed when inhibitors of the JAK-STAT signaling pathway were used in the treatment of COVID-19. The use of IL-6 receptor antagonists in patients with COVID-19 was accompanied by a decrease in the activity of osteodestructive processes. In the absence of immunosuppressive therapy in the treatment of COVID-19, there was a sharp increase in IL-6 and TGF- β 1 in periodontal exudate, activation of bone metabolism, which contributed to the exacerbation of CGP at the post-COVID stage. So, during the exacerbation of CGP after suffering COVID-19, the cytokine composition of the PC content and the features of bone metabolism in the oral cavity depended on the presence and type of immunosuppressive therapy used.

Key words: *chronic generalized periodontitis; new coronavirus infection; immunosuppressive therapy; cytokines.*

For citation: Amhadova M.A., Petrukhina N.B., Sandler I.V., Saltovets M.V., Polyakov V.M., Demidova A.A., Pilipenko K.D. Features of the cytokine composition and bone metabolism of the biological media of the oral cavity in patients with periodontitis after coronavirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 210-214 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-210-214>

For correspondence: Demidova A.A., doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Medical and Biological Physics; e-mail: alald@inbox.ru

Information about authors:

Amhadova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9105-0796>;
Petrukhina N.B., <https://orcid.org/0000-0002-1649-6448>;
Sandler I.V., <https://orcid.org/0000-0002-2326-7774>;
Saltovets M.V., <https://orcid.org/0000-0003-0673-2555>;
Polyakov V.M., <https://orcid.org/0000-0002-7477-3810>;
Demidova A.A., <https://orcid.org/0000-0003-3545-9359>;
Pilipenko K.D., <https://orcid.org/0000-0002-2384-392X>.

Acknowledgments. *The study had no sponsor support.*

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

Received 18.02.2023
Accepted 22.02.2023
Published 00.04.2023

Введение. Хронический генерализованный пародонтит (ХГП) представляет собой хроническое воспалительное заболевание с потерей пародонтальной связки и разрушением окружающей альвеолярной кости [1]. Острое вирусное инфекционное заболевание COVID-19 может привести к прогредиентному течению ХГП с развитием его осложнений, в том числе, и потерей зубов [2]. Вирус SARS-CoV-2 обнаруживается в десневой жидкости, а также выделяется из образцов слюны и мазков из носоглотки [3]. Кроме этого, SARS-CoV-2 выявляется в образцах зубного налета и зубного камня [4, 5]. Мишени вируса SARS-CoV-2 в полости рта представлены эпителиальными клетками слизистой оболочки и фибробластами пародонтальной связки. По итогам крупных исследований [6] выдвинута гипотеза о том, что связь между ХГП и COVID-19 может осуществляться двумя путями. Пря-

мая связь реализуется через рецепторы ангиотензин-превращающего фермента-2 и CD147, используемые вирусом для заражения клеток. Непрямой путь обусловлен местной сверхэкспрессией воспалительных цитокинов, особенно интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-17 [6].

При развитии цитокинового шторма у больных COVID-19 наблюдается неконтролируемое чрезмерное повышение содержания провоспалительных цитокинов в крови, которое приводит к повреждению органов и тканей [7]. Для предотвращения цитокинового шторма используют иммуносупрессивную терапию. Существует несколько способов подавления избыточной секреции ИЛ-6: использование глюкокортикоидов (дексаметазона), ингибиторов сигнального пути JAK-STAT, антицитокиновой терапии в виде антител к ИЛ-6 или антагонистов рецепторов ИЛ-6 [8].

Применение иммуносупрессивной терапии может привести к изменению концентрации цитокинов в местных средах полости рта и сказаться на течении генерализованного пародонтита. Изучение влияния иммуносупрессоров, используемых у больных при острой вирусной инфекции на течение ХГП, может раскрыть терапевтический потенциал такого лечебного воздействия и стать стимулом для новых разработок лечения пародонтита.

В связи с вышеуказанным, целью работы явилось выявить особенности цитокинового состава десневой жидкости и маркера костного метаболизма в смешанной слюне у пациентов с обострением хронического генерализованного пародонтита после перенесенной коронавирусной инфекции с учетом наличия и разновидности иммуносупрессивной терапии.

Материал и методы. Обследованы 108 больных основной группы с диагнозом ХГП средней тяжести в фазе обострения после перенесенного COVID-19 с длительностью постковидного этапа 3-6 месяцев. 1-я группа сравнения включала 71 пациента с диагнозом ХГП средней тяжести в фазе обострения без коронавирусного заболевания в анамнезе. 2-ю группу сравнения формировали из 33 пациентов с перенесенным COVID-19 за 3-6 месяцев до начала исследования. Контрольную группу составили 32 здоровых добровольца. Критерии включения пациентов в основную группу: ХГП средней тяжести в фазе обострения с глубиной пародонтальных карманов 3,5-5 мм (шифр K05.31 по МКБ-10), наличие перенесенного COVID-19, длительность постковидного периода 3-6 месяцев, госпитальное лечение COVID-19, наличие выписного эпикриза после стационарного лечения COVID-19. При включении больных в две группы сравнения критерии по двум заболеваниям совпадали с основной группой: 1-я группа сравнения – по ХГП и 2-я группа сравнения по COVID-19. Критерии исключения: системные заболевания соединительной ткани, злокачественные заболевания, декомпенсация соматических заболеваний.

Возрастные и гендерные характеристики исследуемых групп отражены в табл. 1. Межгрупповые различия по возрасту и полу отсутствовали ($p > 0,05$).

Ротовую жидкость (20 мл) собирали путем сплевывания в пробирку в утренние часы натощак (8-9 ч утра) после ополаскивания полости рта дистиллированной водой. После центрифугирования длительностью 15 мин (8000 об/мин) надосадочный супернатант сливали и путем иммуноферментного анализа

измеряли концентрацию костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ).

Экссудат пародонтальных карманов (ПК) при ХГП или десневую жидкость у пациентов при отсутствии ХГП (контрольная группа и 2-я группа сравнения) забирали с помощью узких стерильных бумажных полосок (3x5 мм). Бумажный штифт помещали на дно пародонтального кармана либо на зубодесневую борозду на 30 секунд для впитывания содержимого, а затем переносили его в пробирку «Эппендорф» со 100 мкл физиологического раствора. С помощью иммуноферментного анализа определяли содержание ИЛ-6 и трансформирующего фактора роста-b1 (ТФР-b1, Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1).

Для определения концентрации изучаемых веществ в биологических средах использовали анализатор Lisa («Эрба Лахема с.р.о.», Чехия), тест-системы Alkphase-B («Metra Biosystems», США), «ИЛ-6-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», г. Новосибирск), Human TGF beta 1 Recombinant Protein, (eBioscience, США).

Добровольное участие пациентов в работе подтверждалось их письменным согласием. Научное исследование одобрено Локальным этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского.

Статистический анализ результатов осуществляли с использованием модулей описательной статистики, дисперсионного анализа в программе Statistica 12.0 (StatSoft, США). Для сравнения показателей четырех групп применяли непараметрический критерий Краскала–Уоллиса, для попарного сравнения критерий Манна-Уитни. Количественные результаты представляли в виде медианы и межквартильного диапазона.

Результаты и обсуждение. Результаты лабораторных показателей биологических сред полости рта у пациентов клинических групп представлены в табл. 2.

У здоровых лиц контрольной группы в десневой жидкости содержание провоспалительного цитокина ИЛ-6 было незначительно и составило 0,2 пг/мл с межквартильным диапазоном 0,1-0,5 пг/мл. У пациентов основной группы при ХГП после перенесенного COVID-19 концентрация ИЛ-6 в содержимом ПК возросла по отношению к контролю в 38 раз ($p < 0,001$) до 7,6 пг/мл и превышала уровень исследуемого цитокина как при ХГП в 1-й группе сравнения (медиана 4,3 пг/мл), так и после COVID-19 (медиана 3,1 пг/мл) во 2-й группе сравнения. При COVID-19 повышение

Таблица 1

Характеристики возраста и пола у пациентов исследуемых групп

Показатель	Основная группа (ХГП+ COVID-19) (n=108)	1-я группа сравнения (ХГП) (n=71)	2-я группа сравнения (COVID-19) (n=33)	Контрольная группа (здоровые лица) (n=32)	p
Возраст, годы	57,8	61,3	56,2	55,1	>0,05
Ме [25-75]	[50,3-65,4]	[53,6-64,9]	[51,4-63,8]	[51,2-60,4]	
Мужчины, абс. (%)	63 (58,3%)	43 (60,6%)	19 (57,6%)	18 (56,3%)	>0,05
Женщины, абс. (%)	45 (41,7%)	28 (39,4%)	14 (42,4%)	14 (43,7%)	>0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2: Ме – медиана, [25-75] – межквартильный диапазон.

Таблица 2

Цитокиновый состав экссудата ПК и десневой жидкости, концентрация КЩФ смешанной слюны у пациентов клинических групп

Показатель	Основная группа (ХГП+COVID-19) (n=108) Ме [25-75]	1-я группа сравнения (ХГП) (n=71) Ме [25-75]	2-я группа сравнения (COVID-19) (n=33) Ме [25-75]	Контрольная группа (здоровые лица) (n=32) Ме [25-75]	p
ИЛ-6, пг/мл	7,6 [5,2-11,4]	4,3 [2,1-7,5]	3,1 [2,5-5,6]	0,2 [0,1-0,5]	<0,001
ТФР-β1, пг/мл	1783 [2627-9026]	3192 [2452-6028]	2317 [1182-4982]	421 [276-627]	<0,001
КЩФ, Ед/мл	76,4 [62,4-85,3]	64,8 [51,8-71,3]	41,6 [33,6-52,3]	24,2 [20,2-28,7]	<0,001

ИЛ-6 в крови ассоциировалось с тяжелым течением заболевания, неблагоприятными исходами, вплоть до летального [9]. Обращает на себя внимание факт, что через 3-6 месяцев после перенесенного COVID-19 концентрация ИЛ-6 в десневой жидкости по сравнению с контролем продолжала быть повышенной. Сочетание COVID-19 и ХГП сопровождалось повышением концентрации ИЛ-6 в экссудате ПК. С ИЛ-6 связывают целый комплекс иммуновоспалительных реакций, к которым можно отнести стимуляцию синтеза белков острой фазы воспаления, активацию Т-хелперов Th17, что способствует переходу от врожденной системы защиты при внедрении инфекционных возбудителей к адаптивной, синтез антител В-лимфоцитами, регуляцию антиинфекционного иммунитета за счет угнетения Т-регуляторных клеток [10]. Одним из биологических эффектов ИЛ-6 является стимуляция процессов остеорезорбции за счет активации остеокластов [11]. Избыточное накопление ИЛ-6 в экссудате ПК может способствовать активации остеодеструктивных процессов, что приводит к усилению остеодеструкции и углублению ПК. У пациентов основной группы при ХГП после перенесенного COVID-19 уровень КЩФ в смешанной слюне возрос в 3,2 раза по отношению к контролю ($p<0,001$), превышал содержание остеомаркера в двух группах сравнения. Данное обстоятельство свидетельствовало об активации у пациентов основной группы костного метаболизма на фоне возросшего уровня медиатора воспаления ИЛ-6.

Один из противовоспалительных механизмов ТФР-β1 реализуется посредством угнетения экспрессии Toll-подобных рецепторов, в частности, TLR4. Как известно, TLR4 связывают липополисахариды грамотрицательных бактерий и способствуют их внедрению в ткани. При усилении экспрессии гена TLR4 происходит активация синтеза и выброса провоспалительных цитокинов [12]. Существует обратная связь между экспрессией ТФР-β1 и RANKL, а также интерлейкина-17 [13]. Выявлено, что снижение синтеза ТФР-β1 приводит к гиперэкспрессии RANKL, что запускает остеокластическую резорбцию костной ткани альвеолярной кости при пародонтите [14]. Нами в исследовании установлено, что у больных при ХГП после перенесенного COVID-19 концентрация ТФР-β1 в содержимом пародонтального кармана возросла по отношению к контролю в 4,2 раза ($p<0,001$), но по отношению к уровню в 1-й и 2-й группах срав-

нения была статистически значимо ниже ($p<0,001$). Данное обстоятельство также способствовало активации остеодеструктивных процессов и углублению ПК.

Среди больных основной группы по выписному эпикризу после госпитального лечения COVID-19 уточняли наличие иммуносупрессивной терапии (ИСТ) и ее разновидности. Из 108 больных основной группы у 35 (32,4%) иммуносупрессивная терапия при лечении COVID-19 отсутствовала. У 32 (29,6%) больных в качестве иммунодепрессантов применяли дексаметазон, у 24 (22,2%) больных антитела к ИЛ-6 (тоцилизумаб, левилимаб) и у 17 (15,7%) пациентов – ингибиторы сигнального пути JAK-STAT (барицитиниб). Далее анализировали цитокиновый состав экссудата ПК и концентрацию КЩФ смешанной слюны в зависимости от особенностей иммуномодулирующего лечения COVID-19 (табл. 3).

При отсутствии иммуносупрессивной терапии в пародонтальном экссудате у пациентов выявлены самые высокие уровни как провоспалительного медиатора ИЛ-6 (медиана 9,7 пг/мл), так и противовоспалительного цитокина ТФР-β1 (медиана 4261 пг/мл), что с одной стороны свидетельствовало об определенном паритете, однонаправленности изменения цитокинов, а с другой – указывало на высокую выраженность иммуновоспалительных реакций в пародонте. При применении глюкокортикоидной терапии содержание ИЛ-6 в содержимом ПК снижалось, но возросший уровень КЩФ в слюне свидетельствовал о высокой интенсивности костного метаболизма и активности остеодеструктивных процессов. Самый низкий уровень КЩФ, косвенно свидетельствующий о высокой минерализации костной ткани и отсутствии костного ремоделирования альвеолярных отростков челюстей

Таблица 3

Цитокиновый состав экссудата ПК, концентрация КЩФ смешанной слюны у пациентов основной группы с учетом терапии COVID-19

Показатель	Основная группа (ХГП+COVID-19) (n=108) Ме [25-75]				p
	ИСТ- (n=35)	ИСТ+ дексаметазон (n=32)	ИСТ+ Антицитокины (n=24)	ИСТ+ ингибиторы JAK-STAT (n=17)	
ИЛ-6, пг/мл	9,7 [7,5-11,3]	5,7 [4,6-6,9]	7,4 [5,5-8,7]	2,2 [1,3-4,0]	<0,001
ТФР-β1, пг/мл	4261 [4392-6981]	3829 [3287-6082]	3026 [2178-4926]	1135 [984-1785]	<0,001
КЩФ, Ед/мл	67,1 [61,3-79,5]	99,5 [86,4-116,7]	33,2 [26,8-39,7]	61,7 [50,2-73,8]	<0,001

наблюдали при применении антицитокиновой терапии антагонистами рецепторов ИЛ-6. Содержание ИЛ-6 после применения антицитокиновой терапии хоть и оставалось повышенным, но объяснялось тем, что препараты блокировали рецепторы ИЛ-6, но не влияли на его содержание. Повышенный уровень ИЛ-6 в экссудате ПК, вероятно, объяснял и повышенное содержание изучаемого ростового фактора. При использовании ингибиторов сигнального пути JAK-STAT отмечалось резкое снижение ИЛ-6 и ТФР- β 1 в содержимом ПК, что свидетельствовало о резком подавлении активности иммуновоспалительных процессов в пародонте. Но активность местного костного метаболизма при применении ингибиторов сигнального пути JAK-STAT не изменялась по сравнению с больными, у которых иммуносупрессивная терапия отсутствовала.

Итак, для ингибиторов сигнального пути JAK-STAT установлена наибольшая эффективность в отношении ограничения иммуновоспалительных реакций в полости рта при ХГП, а снижение костного ремоделирования в большей мере наблюдалось при использовании антагонистов рецепторов ИЛ-6. При применении дексаметазона резко возрастала интенсивность остеорезорбции, что может способствовать прогрессированию остеодеструкции и углублению пародонтальных карманов. Использование лекарственных препаратов, ингибирующих активность цитокина ИЛ-6 и JAK-STAT сигнальный путь, перспективно при обострении хронического пародонтита как в отношении ограничения местного воспаления, так и в отношении регуляции костного ремоделирования. Установленные механизмы влияния системно применяемых иммуносупрессоров могут стать толчком в развитии местной иммунотерапии при лечении хронического генерализованного пародонтита, направленной на ограничение ИЛ-6 и его модулирующего влияния на костное ремоделирование.

Выводы:

1. При обострении ХГП после перенесенного COVID-19 цитокиновый состав содержимого пародонтальных карманов и особенности костного метаболизма в полости рта зависят от наличия и вида используемой иммуносупрессивной терапии.

2. При использовании в лечении COVID-19 дексаметазона на фоне снижения ИЛ-6 в пародонтальном экссудате наблюдается выраженная активация костного метаболизма с повышением костного изомера щелочной фосфатазы в смешанной слюне.

3. Эффективное угнетение иммуновоспалительных реакций в полости рта наблюдается при использовании в лечении COVID-19 ингибиторов сигнального пути JAK-STAT.

4. При применении антагонистов к рецепторам ИЛ-6 у больных COVID-19, последующее определение в экссудате пародонтальных карманов концентрации ИЛ-6, не отражает активности иммуновоспалительных реакций, но сопровождается снижением активности остеодеструктивных процессов.

5. Отсутствие иммуносупрессивной терапии при лечении COVID-19 сопровождается резким повышением ИЛ-6 и ТФР- β 1 в пародонтальном экссудате,

активацией костного метаболизма, что способствует обострению хронического генерализованного пародонтита на постковидном этапе.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-11, 13 см. REFERENCES)

1. Зорина О.А., Абаев З.М., Магомедов Р.Н., Проходная В.А., Максимова Е.С. Диагностическая информативность определения остеомаркеров в сыворотке крови при хроническом генерализованном пародонтите средней и тяжелой степени. *Стоматология*. 2019; 98(1): 17-20.
2. Трухан Д.И., Сулимов А.Ф., Трухан Л.Ю. Возможные ассоциации патологии пародонта и новой коронавирусной инфекции (COVID-19). *Клинический разбор в общей медицине*. 2022; 2: 6-12.
12. Москалёв А.В., Рудой А.С., Апчел А.В., Зуева В.О., Казымова О.Э. Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2016; 2(54): 206-16.
14. Зорина О.А., Ганковская Л.В., Балькин Р.А., Иванюшко Т.П. Молекулярные механизмы патогенеза пародонтита. *Стоматология для всех*. 2017; 3: 41-5.

REFERENCES

1. Zorina O.A., Abaev Z.M., Magomedov R.N., Prokhodnaya V.A., Maksyukova E.S. Diagnostic informativeness of determination of osteomarkers in blood serum in chronic generalized periodontitis of moderate and severe degree. *Stomatologiya*. 2019; 98(1): 17-20. DOI: 10.17116/stomat2019980117/. (in Russian)
2. Trukhan D.I., Sulimov A.F., Trukhan L.Yu. Possible associations of periodontal pathology and novel coronavirus infection (COVID-19). *Klinicheskiy razbor v obshchey meditsine*. 2022; 2:6-12. DOI: 10.47407/kr2022.3.2.00120. (in Russian)
3. Gupta S., Mohindra R., Chauhan P.K., Singla V., Goyal K., Sahni V. et al. SARS-CoV-2 Detection in Gingival Crevicular Fluid. *J. Dent. Res.* 2021; 100(2): 187-93. DOI: 10.1177/0022034520970536.
4. Gomes S.C., Fachin S., da Fonseca J.G., Angst P.D., Lamers M.L., da Silva I.S. et al. Dental biofilm of symptomatic COVID-19 patients harbours SARS-CoV-2. *J. Clin. Periodontol.* 2021; 48 (7): 880-5. DOI: 10.1111/jcpe.13471.
5. Berton F., Rupel K., Florian F., Biasotto M., Pallavicini A., di Lenarda R. Dental calculus: a reservoir for detection of past SARS-CoV-2 infection. *Clin. Oral. Investig.* 2021; 25 (8): 5113-4. DOI: 10.1007/s00784-021-04001-8.
6. Campisi G., Bizzoca M.E., Lo Muzio L. COVID-19 and periodontitis: reflecting on a possible association. *Head Face Med.* 2021; 17 (1): 16. DOI: 10.1186/s13005-021-00267-1.
7. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020 Mar 28; 395(10229): 1033-4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
8. Stebbing J., Phelan A., Griffin I., Tucker C., Oechsle O., Smith D., Richardson P. COVID-19: combining antiviral and anti-inflammatory treatments. *Lancet Infect. Dis.* 2020 Apr; 20(4): 400-2. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30132-8.
9. Conti P., Ronconi G., Caraffa A., Gallenga C.E., Ross R., Frydas I., Kritas S.K. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVID-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2020; 34(2): 327-31. DOI: 10.23812/CONTI-E.
10. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 2015; 15: 448-57. DOI: 10.1038/ni1117-1271b.
11. Liu X., Jones G.W., Choy E.H., Jones S.A. The biology behind interleukin-6 targeted interventions. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2016; 28: 152-60. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000255.
12. Moskalev A.V., Rudoy A.S., Apchel A.V., Zueva V.O., Kazymova O.E. Features of the biology of transforming growth factor β and immunopathology. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2016; 2(54): 206-16. (in Russian)
13. Arumugam B., Vairamani M., Partridge N.C., Selvamurugan N. Characterization of Runx2 phosphorylation sites required for TGF- β 1-mediated stimulation of matrix metalloproteinase-13 expression in osteoblastic cells. *J. Cell Physiol.* 2018; 233:1082-94. DOI: 10.1002/jcp.25964.
14. Zorina O.A., Gankovskaya L.V., Balykin R.A., Ivanyushko T.P. Molecular mechanisms of the pathogenesis of periodontitis. *Stomatologiya dlya vsekh*. 2017; 3: 41-5. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Крысалова Т.И.^{1,2}, Калаев В.Н.², Калаева Е.А.², Игнатова И.В.²

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ОКРАШИВАНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ШЕЙКИ МАТКИ

¹ БУЗ ВО «Воронежская городская клиническая поликлиника № 18» Минздрава РФ, 394074, Воронеж, Россия;

² ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, 394018, Воронеж, Россия

Целью работы явилось исследование влияния окрашивания азур-эозином по Романовскому или гематоксилин-эозином препаратов многослойного плоского неороговевающего и цилиндрического эпителия шейки матки на выявляемость аберраций и точность результатов. Обследованы 20 женщин 20-35 лет с воспалением шейки матки и эрозией, одними родами, отсутствием медицинских абортов и выкидышей в анамнезе, проживающих в районе г. Воронежа, прикрепленном к БУЗ ВО «ВГКП № 18». Цитологический материал от каждой обследуемой распределяли на 2 стекла, одно окрашивали азур-эозином, второе – гематоксилин-эозином и микроскопировали. Регистрировали клетки с одним или несколькими микроядрами, протрузиями, двумя или несколькими ядрами, ядрами атипичной формы, конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра, апоптозными тельцами, липидными гранулами и гранулами гликогена, одной или несколькими насечками (перетяжками), перинуклеарными вакуолями, конденсированным хроматином, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и суммарную долю клеток с нарушениями. Вычисляли частоту встречаемости клеток с определенными аномалиями (%). Для многослойного плоского неороговевающего эпителия, окрашенного гематоксилин-эозином или азур-эозином, были получены сходные результаты встречаемости большинства типов аномалий кроме апоптозных телец, которые чаще обнаруживали при использовании азур-эозина, и липидных гранул и гранул гликогена, которые чаще выявляли при окрашивании гематоксилин-эозином. Цилиндрический эпителий оказался более чувствительным к выбору красителя: при использовании азур-эозина ядра с насечками, атипичной формы, перинуклеарными вакуолями, конденсацией хроматина, вакуолизированные, с началом кариолизиса, клетки с гранулами липидов и гликогена выявляли чаще, чем при применении гематоксилин-эозина. Тип красителя не оказывал существенного влияния на точность результатов. В целом азур-эозин по Романовскому представляется более предпочтительным для окрашивания клеток эпителия шейки матки. Различия результатов анализа, связанные с использованием определенного типа красителя, необходимо учитывать при проведении скрининговых исследований и постановке диагноза.

Ключевые слова: многослойный плоский неороговевающий эпителий; цилиндрический эпителий; аномалии ядра; азур-эозин по Романовскому-Гимзе, гематоксилин-эозин.

Для цитирования: Крысалова Т.И., Калаева Е.А., Калаев В.Н., Игнатова И.В. Влияние способа окрашивания на результаты цитологического исследования эпителия шейки матки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 215-223. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-215-223>

Для корреспонденции: Калаева Елена Анатольевна, канд. биол. наук, доцент; e-mail: kalaevae@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.02.2023

Принята к печати 10.03.2023

Опубликовано 00.04.2023

Krysalova T.I.^{1,2}, Kalaeva E.A.¹, Kalaev V.N.¹, Ignatova I.V.¹

THE INFLUENCE OF THE METHOD OF STAINING ON THE RESULTS OF CYTOLOGICAL STUDY OF THE CERVICAL EPITHELIUM

¹ Voronezh City Clinical Polyclinic No. 18 Ministry of Health of the Russian Federation, 394074, Voronezh, Russia;

² Voronezh State University Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 394018, Voronezh, Russia

The aim of the work was to study the effect of staining with azure-eosin according to Romanovsky or hematoxylin-eosin of preparations of stratified squamous nonkeratinizing and cylindrical epithelium of the cervix on the detection of aberrations and the accuracy of the results. We examined 20 women aged 20-35 years with cervical inflammation and erosion, one childbirth, no medical abortions and miscarriages in history, living in the area of Voronezh, attached to the polyclinic No. 18. Cytological material from each subject was distributed on two slides, one was stained with azure-eosin, the second – with hematoxylin-eosin. Cells with micronuclei, protrusions, nuclei, atypically shaped nuclei, condensed chromatin, nuclear vacuolization, apoptotic bodies, lipid and glycogen granules, notches, perinuclear vacuoles, condensed chromatin, karyorrhexis, karyopyknosis, karyolysis and the total proportion of cells with disorders were registered. The frequency of occurrence of cells with certain anomalies (%) was calculated. For stratified squamous nonkeratinized epithelium stained with hematoxylin-eosin or azure-eosin, similar results were obtained, except for apoptotic bodies, which were more often when using azure-eosin, and lipid and glycogen granules, which were more often with hematoxylin-eosin. Cylindrical epithelium turned out to be more sensitive to the choice of dye: when using azure-eosin, nuclei with notches, atypical shape, perinuclear vacuoles, chromatin condensation, vacuolated, karyolysis, lipid and glycogen granules were detected more often than when using hematoxylin-eosin. The type of dye did not significantly affect the results accuracy. In general, azure-eosin seems to be more preferable for staining cervical

epithelial cells. Differences in the results of the analysis must be taken into account when conducting screening studies and making a diagnosis.

Key words: *stratified squamous nonkeratinized epithelium; cylindrical epithelium; nucleus anomalies; azure-eosin according to Romanovsky-Giemsa, hematoxylin-eosin.*

For citation: Krysalova T.I., Kalaeva E.A., Kalaev V.N., Ignatova I.V. The influence of the method of staining on the results of cytological study of the cervical epithelium. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4->

For correspondence: *Kalaeva Elena Anatolyevna*, Ph.D. Biol. Sci., Associate Professor; e-mail: kalaevae@gmail.com

Information about authors:

Krysalova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-6360-5088>;
Kalaeva E.A., <https://orcid.org/0000-0002-3668-0816>;
Kalaev V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4247-4509>;
Ignatova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-3504-0304>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 09.02.2023

Accepted 10.03.2023

Published 00.04.2023

Введение. Молекулярные методы диагностики постепенно вытесняют цитологические из протоколов скрининга, однако цитологическое исследование относится к основным методам диагностики состояния шейки матки [1-4]. Цитологический анализ не только является основой ранней диагностики злокачественных новообразований и предопухолевых трансформаций, но и позволяет обнаружить косвенные признаки HPV-инфекции, HSV-инфекцию, *Cytomegalovirus* и другую фоновую патологию шейки матки [5-6]. В последние десятилетия ведется интенсивная разработка методов раннего выявления и диагностики диспластических состояний, рака шейки матки [7-11] и атипии железистого эпителия [12-14], активно дорабатывается классификация Bethesda для цервикальной жидкостной цитологии [15-17]. Разные авторы и лаборатории проводят исследования с использованием различных ядерных красителей, что может отразиться на результатах выявляемости отдельных патологий [18-20]. Влияние красителей на частоту встречаемости клеток с нарушениями было описано рядом авторов. Так, Т.С. Колмаковой и соавт. [21] было изучено влияние клеточных красителей на частоту встречаемости аберрантных клеток, микроядер, феномена «разбитого яйца», кариопикноза, кариорексиса, двуядерных клеток, амитоza, лизиса. В.Н. Калаев и соавт. [22, 23] показали, что оптимальным красителем для выявления ядерных аномалий в клетках буккального эпителия человека является азур-эозин по Романовскому – Гимзе. И.В. Юрасова и соавт. [24] отмечали неодинаковое качество окрашивания ядерного и стромального компонентов при использовании разных красителей. Однако, В.И. Новик [25] указывал, что при проведении плоидометрических измерений на препаратах эпителия шейки матки, окрашенных гематоксилин-эозином и переокрашенных по Фельгену, результаты совпадают. В России во многих цитологических лабораториях основным способом окрашивания микропрепаратов является азур-эозин по Романовскому и гематоксилин-эозин. Преимущества окрашивания азур-эозином по Романовскому описаны в работах некоторых авторов [7, 26, 27]. В рабо-

те И.П. Шабаловой [5] отмечено, что у окрашивания азур-эозином по Романовскому и гематоксилин-эозином есть как свои преимущества, так и недостатки. Рекомендации по окрашиванию цитологических препаратов в РФ отражены в ГОСТ Р 57005-2016 и ГОСТ Р 1.0-2012. Однако в проанализированной нами литературе не обнаружено данных о влиянии окрашивания азур-эозином по Романовскому и гематоксилин-эозином на частоту выявления клеток с аномалиями и на точность полученных результатов.

В связи с этим целью нашей работы был сравнительный анализ встречаемости аберрантных клеток в многослойном плоском неороговевающем эпителии и цилиндрическом эпителии шейки матки при окрашивании азур-эозином по Романовскому и гематоксилин-эозином. Решение этой задачи позволит выбрать оптимальный способ окрашивания для выявления клеточных и ядерных аномалий в эпителиальных клетках.

Материал и методы. Сбор и анализ материала для исследования проводили на базе БУЗ ВО «ВГКП № 18». Были обследованы 20 женщин 1988-1997 года рождения. Критериями включения в группу были: возраст 20-35 лет, наличие воспаления шейки матки и эрозии, в анамнезе одни роды, отсутствие абортов, выкидышей, проживание в районе г. Воронежа, территориально прикрепленном к БУЗ ВО «ВГКП № 18». Забор материала производили в середине менструального цикла. От всех пациенток было получено добровольное, информированное согласие на обследование.

Перед получением материала шейку матки обнажали в зеркалах, никаких манипуляций не производили: шейку ничем не смазывали, слизь не удаляли или, если слизи много, удаляли ее частично тампоном, не надавливая на шейку. Щетку вводили в наружный зев шейки матки, осторожно направляя центральную часть щетки по оси цервикального канала. Затем щетку-наконечник поворачивали на 360° по часовой стрелке от 3-х до 5-ти раз, для получения достаточного количества клеток с эктоцервикса, эндоцервикса и зоны трансформации. Щетки выводили и распределяли материал тонким слоем по предметному стеклу. Параметры стандартного нанесения мазка:

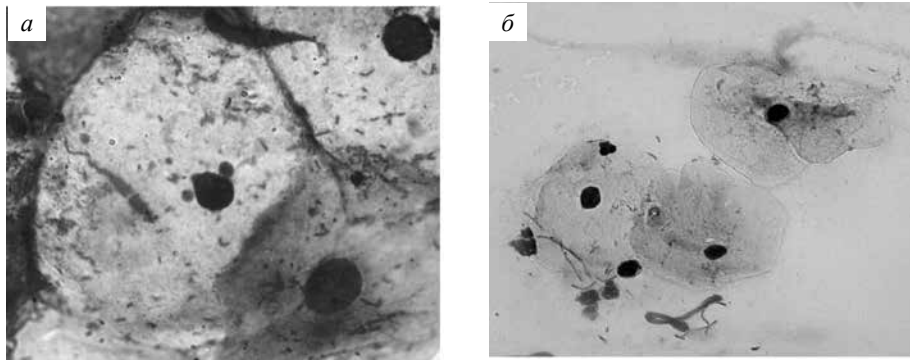


Рис. 1. Поверхностные клетки многослойного плоского неороговевающего эпителия. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. а – Ув. x1000, масляная иммерсия; б – Ув. x400.

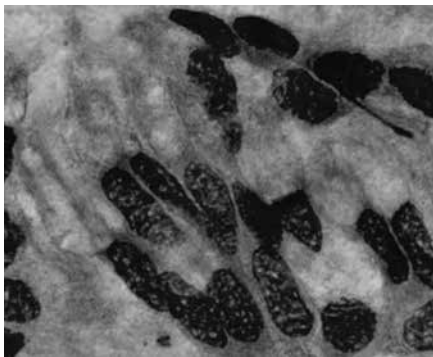


Рис. 2. Клетки цилиндрического эпителия. Окрашивание азур-эозином по Романовскому. Ув. x1000 (масляная иммерсия).

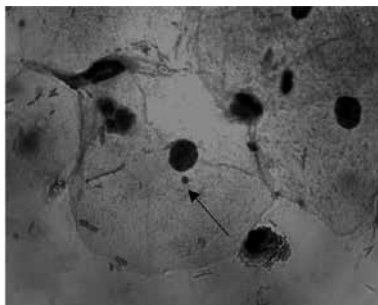


Рис. 3. Поверхностная клетка многослойного плоского неороговевающего эпителия с микроядром (отмечено стрелкой). Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. x1000 (масляная иммерсия).

начало мазка на расстоянии 1–1,5 см от узкого края предметного стекла, конец – на расстоянии 2–2,5 см от противоположного края. У каждой женщины брали анализ на два стекла. После нанесения клеточный материал высушивали на воздухе (сухая фиксация) и затем окрашивали: одно стекло по Романовскому (азур-эозиновой смесью) [28], а второе – гематоксилин-эозином [28, 29]. Анализ препаратов осуществляли на микроскопе Микмед-6 (ЛОМО, Россия). Фотографии делали при помощи цифровой камеры Leica DFC 295 (Leica Microsystems AG, Германия). На каждом препарате анализировали не менее 1000 клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия и 500 клеток цилиндрического эпителия. Всего было проанализировано 40 микропрепаратов (40 000 клеток многослойного плоского неорогове-

вающего эпителия и 20 000 клеток цилиндрического эпителия). Для каждого микропрепарата вычисляли частоту встречаемости клеток с аномалиями ядра в многослойном плоском неороговевающем эпителии и цилиндрическом эпителии как отношение числа клеток с той или иной аберрацией к общему числу проанализированных клеток (%).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Stadia 7.0 Professional (InCo, Россия). Группировку данных и их обработку осуществляли согласно рекомендациям [30]. Вычисляли среднее, медиану, ошибку среднего, определяли 95-% доверительный интервал среднего. Сравнение выборок проводили с использованием непараметрического критерия Ван-дер-Вардена, так как распределение частот встречаемости аберрантных клеток не подчинялось нормальному закону. Сравнение разбросов значений выборок осуществляли с использованием критерия Ансари-Бредли. Сравнение частот встречаемости отдельных типов аномалий в спектре нарушений осуществляли с использованием Z-аппроксимации для критерия равенства частот. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$.

Результаты. Препараты лучшего качества получали при применении азур-эозина по Романовскому – Гимзе: окрашивание было однородным, насыщенным и глубоким; клетки имели четкие края; просматривалась структура хроматина, детали строения ядра и цитоплазмы; в цитоплазме клеток были отчетливо видны секреторные гранулы, микроядра; слизь окрашивалась в розовый цвет (рис. 1, а, б, рис. 2); при наличии идентифицировалась бактериальная флора и простейшие.

В препаратах многослойного плоского неороговевающего эпителия при окрашивании азур-эозином по Романовскому и гематоксилин-эозином были обнаружены следующие клеточные формы: клетка с нормальным ядром, клетка с микроядром (рис. 3), клетка с несколькими микроядрами (рис. 4), ядро с протрузией, ядро с несколькими протрузиями, клетка с микроядрами и протрузиями, двуйдерная клетка, ядро с насечкой (перетяжкой), ядро с несколькими насечками (перетяжками), ядро атипичной формы, ядро с перинуклеарными вакуолями, ядро с конденсированным хроматином, клетка с конденсированным хроматином и вакуолизированным ядром, кариорексис, ка-

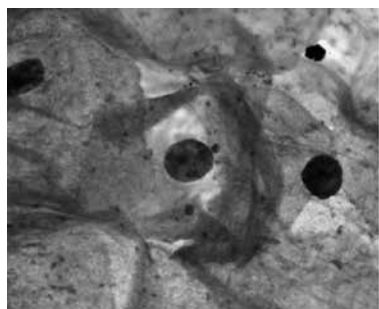


Рис. 4. Клетка многослойного плоского неороговевающего эпителия с несколькими микроядрами. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. x1000 (масляная иммерсия).

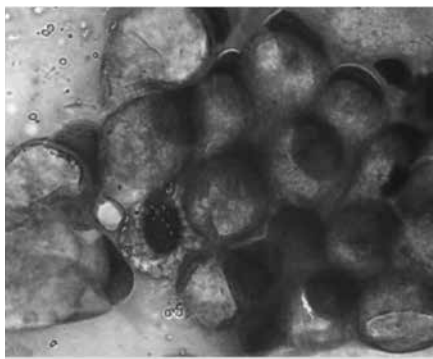


Рис. 5. Клетка цилиндрического эпителия с нормальным ядром. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. x1000 (масляная иммерсия).

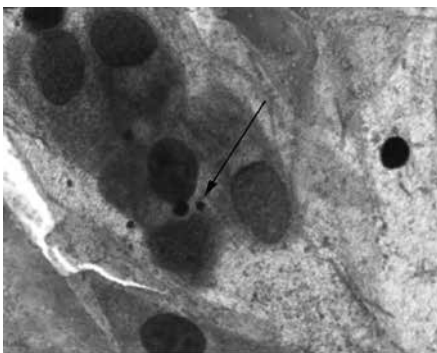


Рис. 6. Микроядро (отмечено стрелкой) в клетке цилиндрического эпителия. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. x1000 (масляная иммерсия).

риопикноз, начало кариолизиса, ядро с апоптозными тельцами, клетка с липидными гранулами и гранулами гликогена в цитоплазме.

Частота встречаемости клеток с ядерными аномалиями в многослойном плоском неороговевающем эпителии шейки матки представлена в табл. 1. При окрашивании азур-эозином по Романовскому в микропрепаратах чаще выявляли клетки с апоптозными тельцами ($p < 0,01$), а при окрашивании гематоксилин-эозином – клетки с липидными гранулами и гранулами гликогена ($p < 0,001$). Различий между частотой встречаемости остальных типов аберраций в образцах, окрашенных азур-эозином и гематоксилин-эозином, не было выявлено.

Коэффициенты вариации частоты встречаемости клеток с микроядрами и протрузиями при окрашивании гематоксилин-эозином и азур-эозином по Романовскому достоверно различались ($p < 0,05$). Для остальных видов клеточных аномалий различий коэффициентов вариации выявлено не было (табл. 1).

Спектры ядерных аберраций в клетках многослойного плоского неороговевающего эпителия шейки матки при различных способах окрашивания представлены в табл. 2. Наиболее распространенным нарушением, обнаруживаемым при окрашивании как азур-эозином, так и гематоксилин-эозином, были ядра с кариопикнозом (32,41 и 30,19 %, соответственно, различия достоверны, $p < 0,001$). Следующими по частоте встречаемости нарушениями были: конденсация хроматина, апоптозные тельца, конденсация хроматина и вакуолизированное ядро, липидные гранулы и гранулы гликогена в цитоплазме.

В цилиндрическом эпителии шейки матки при окрашивании азур-эозином по Романовскому и гематоксилин-эозином были выявлены следующие клеточные формы: клетки с нормальными ядрами (рис. 5), клетка с микроядром (рис. 6), ядро с протрузиями, многоядерная клетка, ядро с насечками (перетяжками), ядро атипичной формы, ядро с перинуклеарными вакуолями, ядро с краевой конденсацией хроматина, ядро с конденсированным хроматином, клетка с конденсированным хроматином и вакуолизированным ядром, начало кариолизиса, кариопикноз, клетка с гранулами секрета в цитоплазме.

Частота встречаемости клеток с ядерными аномалиями в цилиндрическом эпителии шейки матки представлена в табл. 3. При окрашивании азур-эозином по Романовскому чаще, чем при окрашивании гематоксилин-эозином выявляли клетки с ядром атипичной формы ($p < 0,05$); ядром с насечками ($p < 0,05$); конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра ($p < 0,05$); началом кариолизиса ($p < 0,05$); гранулами секрета ($p < 0,05$). Суммарно доля клеток с нарушениями была также выше при окрашивании азур-эозином по Романовскому ($p < 0,001$).

Различия коэффициентов вариации при использовании разных способов окрашивания были выявлены для следующих показателей: ядра с протрузиями, многоядерные клетки, ядра с насечками (см. табл. 3).

Спектры аномалий ядра в клетках цилиндрического эпителия шейки матки, выявляемых при окрашивании азур-эозином и гематоксилин-эозином, представлены в табл. 4. При окрашивании по Романовскому-Гимза в спектре преобладали клетки с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра, с конденсированным хроматином, с гранулами секрета в цитоплазме. При окрашивании препаратов цилиндрического эпителия шейки матки гематоксилин-эозином в спектре нарушений преобладали клетки с ядром с конденсированным хроматином, с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра, с ядром атипичной формы.

Различия в спектрах встречаемости нарушений в клетках цилиндрического эпителия шейки матки при различных способах окрашивания отмечены

Частота встречаемости клеток с аномалиями в многослойном плоском неороговевающем эпителии шейки матки при различных способах окрашивания

Типы клеточных нарушений	Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе (n=20)		Окраска гематоксилин-эозином (n=20)	
	X±m, %, Me, 95% CI	CV, %	X±m, %, Me, 95% CI	CV, %
Клетка с микроядром	5,00 ± 1,21 2,50 2,49 – 7,51	108,40	5,50 ± 0,98 4,00 3,47 – 7,53	79,64
Клетка с несколькими микроядрами	0,80 ± 0,34 0 0,09 – 1,51	192,50	0,75 ± 0,38 0 0 – 1,54	228,00
Ядро с протрузией	8,35 ± 1,13 9,00 6,02 – 10,68	60,48	7,65 ± 1,18 7,50 5,22 – 10,08	68,76
Ядро с несколькими протрузиями	1,75 ± 0,78 0,50 0,14 – 3,36	199,43	1,75 ± 0,73 0 0,24 – 3,26	186,28
Клетка с микроядрами и протрузиями	0,65 ± 0,38 0 0 – 1,43	260,00	0,70 ± 0,37 0 0 – 1,47	237,14*
Двуядерная клетка	0,90 ± 0,27 0 0,34 – 1,46	134,44	0,60 ± 0,27 0 0,03 – 1,17	205,00
Ядро с насечкой (перетяжкой)	0,85 ± 0,30 0 0,23 – 1,47	158,82	0,60 ± 0,22 0 0,14 – 1,06	165,00
Ядро с несколькими насечками (перетяжками)	0,10 ± 0,07 0 0 – 0,24	310,00	не обнаружено	–
Ядро атипичной формы	5,40 ± 1,61 3,00 2,07 – 8,73	133,33	4,50 ± 1,38 1,00 1,65 – 6,15	136,89
Ядро с перинуклеарными вакуолями	2,40 ± 1,01 0 0,29 – 4,51	190,00	2,05 ± 0,65 0,50 0,70 – 3,40	141,95
Ядро с конденсированным хроматином	103,70 ± 14,38 87,00 77,56 – 137,04	59,93	105,20 ± 21,97 92,50 59,76 – 150,64	93,40
Клетка с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра	37,90 ± 6,10 25,00 25,29 – 50,51	71,93	40,90 ± 9,78 25,00 20,67 – 61,13	106,94
Кариорексис	4,65 ± 3,16 0 0 – 11,18	303,44	5,05 ± 3,26 0 0 – 11,80	288,91
Кариопикноз	140,40 ± 30,05 92,00 78,25 – 202,55	95,73	115,30 ± 22,27 79,00 69,25 – 161,35	86,36
Начало кариолизиса	28,20 ± 7,60 15,00 12,48 – 43,92	120,53	26,40 ± 5,86 15,50 14,29 – 38,51	99,24
Апоптозные тельца	85,35 ± 25,67 56,00** 32,25 – 138,45	134,50	59,45 ± 18,24 28,00 21,73 – 97,71	137,21
Клетка с липидными гранулами и гранулами гликогена	3,15 ± 1,54 0*** 0 – 6,33	218,41	5,35 ± 2,13 0,50 0,95 – 9,75	177,76
Доля клеток с нарушениями	376,30 ± 30,66 353,50 312,90 – 439,70	36,43	381,70 ± 33,54 371,00 312,34 – 451,06	39,30

Примечание. Здесь и в табл. 2 – 4: n – число проанализированных микропрепаратов; различия между способами окрашивания достоверны: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001.

Таблица 2

Спектры ядерных аберраций в многослойном плоском неороговевающем эпителии шейки матки, выявляемых при различных способах окрашивания

Типы ядерных аномалий, %	Окраска азур-эозином по Романовскому-Гимзе (n=20)	Окраска гематоксилин-эозином (n=20)
Клетка с микроядром	1,15	1,44
Клетка с несколькими микроядрами	0,18	0,20
Ядро с протрузией	1,93	2,00
Ядро с несколькими протрузиями	0,40	0,46
Клетка с микроядрами и протрузиями	0,15	0,18
Двухъядерная клетка	0,21	0,16
Ядро с насечкой (перетяжкой)	0,20	0,16
Ядро с несколькими насечками (перетяжками)	0,02	–
Ядро атипичной формы	1,25	1,18
Ядро с перинуклеарными вакуолями	0,55	0,54
Ядро с конденсированным хроматином	24,77	27,56***
Клетка с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра	8,75	10,71***
Кариорексис	1,07	1,32
Кариопикноз	32,41	30,19***
Начало кариолизиса	6,51	6,92
Апоптозные тельца	19,71	15,57***
Клетка с липидными гранулами и гранулами гликогена	0,73	1,40***
Всего клеток с нарушениями	8661	7634

Таблица 3

Частота встречаемости клеток с аномалиями в цилиндрическом эпителии шейки матки при различных способах окрашивания

Типы клеточных нарушений	Окрашивание азур-эозином по Романовскому-Гимзе (n=20)		Окраска гематоксилин-эозином (n=20)	
	X±m, %, Ме, (95% CI)	CV, %	X±m, %, Ме, (95% CI)	CV, %
Микроядро	1,60 ± 0,47	131,87	1,40 ± 0,48	154,28
	0		0	
	0,62 – 2,58		0,40 – 2,40	
Ядро с протрузиями	32,70 ± 3,23	44,13	32,10 ± 2,10	29,25*
	34,00		32,00	
	26,03 – 39,37		27,76 – 36,44	
Многоядерная клетка	0,90 ± 0,45	222,22	0,40 ± 0,23	262,50***
	0		0	
	0 – 1,82		0 – 0,88	
Ядро с насечками (перетяжками)	29,20 ± 2,32	36,06	23,70 ± 1,56	29,41**
	28,00*		25,00	
	24,33 – 34,07		20,48 – 26,92	
Ядро атипичной формы	51,80 ± 9,74	84,15	41,00 ± 10,87	118,51
	40,00*		25,00	
	31,64 – 71,96		18,53 – 63,47	
Ядро с перинуклеарными вакуолями	14,40 ± 2,85	88,61	9,70 ± 1,31	60,31
	10,00		10,00	
	8,50 – 20,30		6,99 – 12,41	
Ядро с краевой конденсацией хроматина	7,80 ± 2,21	126,67	6,50 ± 2,80	196,46
	5,00		4,00	
	3,23 – 12,37		0,71 – 12,29	
Ядро с конденсированным хроматином	221,00 ± 44,97	90,99	220,00 ± 47,32	96,18
	135,00		105,00	
	127,99 – 314,01		122,13 – 317,87	

Продолжение табл. 3 см. 221.

Типы клеточных нарушений	Окрашивание азур-эозином по Романовскому-Гимзе (n=20)		Окраска гематоксилин-эозином (n=20)	
	X±m, %, Me, (95% CI)	CV, %	X±m, %, Me, (95% CI)	CV, %
Клетка с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра	290,50 ± 35,09 290,00* 217,93 – 363,07	54,01	219,00 ± 35,58 200,00 145,40 – 292,60	72,65
Начало кариолизиса	17,80 ± 0,90 17,00* 15,93 – 19,67	22,75	12,90 ± 0,77 13,00 11,30 – 14,50	26,82
Кариопикноз	5,10 ± 0,49 6,00 4,08 – 6,12	43,14	5,40 ± 0,33 6,00 4,72 – 6,08	27,04
Клетка с гранулами секрета	79,80 ± 10,45 68,00* 58,18 – 101,42	58,58	16,70 ± 2,04 15,00 12,47 – 20,93	54,73
Доля клеток с нарушениями	752,60 ± 61,31 707,00*** 625,80 – 879,40	36,43	588,80 ± 58,34 562,00 468,10 – 709,50	44,31

Таблица 4

Спектры клеточных нарушений в цилиндрическом эпителии шейки матки, выявляемых при различных способах окрашивания

Виды ядерных патологий, %	Окрашивание азур-эозином по Романовскому (n=20)	Окрашивание гематоксилин-эозином (n=20)
Клетка с микроядром	0,21	0,24
Ядро с протрузиями	4,34	5,45**
Многоядерная клетка	0,12	0,07
Ядро с насечками (перетяжками)	3,88	4,02
Ядро атипичной формы	6,88	6,96
Ядро с перинуклеарными вакуолями	1,91	1,65
Ядро с краевой конденсацией хроматина	1,04	1,10
Ядро с конденсированным хроматином	29,36	37,36***
Клетка с конденсированным хроматином и вакуолизацией ядра	38,60	37,19
Начало кариолизиса	2,36	2,19
Кариопикноз	0,68	0,92
Клетка с гранулами секрета	10,60	2,84***
Всего клеток с нарушениями	7526	5888

по следующим типам аномалий: ядро с протрузиями ($p < 0,01$), ядро с конденсированным хроматином ($p < 0,001$), клетки с гранулами секрета ($p < 0,01$).

Обсуждение. При окрашивании многослойного плоского неороговевающего эпителия шейки матки гематоксилин-эозином и азур-эозином по Романовскому – Гимзе были получены сходные значения встречаемости большинства типов аномалий. Исключение составили клетки с апоптозными тельцами, которые чаще обнаруживали при использовании азур-эозина по Романовскому, и клетки с липидными гранулами и гранулами гликогена, которые чаще выявляли при окрашивании гематоксилин-эозином. Разброс результатов определения частоты встречаемости клеток с микроядрами и протрузиями в многослойном плоском неороговевающем эпителии был немного ниже при использовании гематоксилин-эозина; для остальных аномалий различий в разбросах не было выявлено. При окрашивании клеток цилиндрического эпителия азур-эозином по Романовскому было обнаруже-

но большее количество нарушений: чаще выявляли клетки с ядром с насечками (перетяжками), ядрами атипичной формы, перинуклеарными вакуолями, началом кариолизиса, гранулами секрета в цитоплазме. Точность определения частот встречаемости ядерных протрузий и ядер с насечками была выше при использовании гематоксилин-эозина. Таким образом, цилиндрический эпителий оказался более чувствительным к выбору красителя, чем многослойный плоский неороговевающий эпителий, так как при использовании азур-эозина ряд клеточных патологий выявлялся чаще, чем при применении гематоксилин-эозина. При этом тип красителя не оказывал существенного влияния на точность результатов. В целом, по нашему мнению, окраска азур-эозином по Романовскому более предпочтительна для окрашивания клеток многослойного плоского неороговевающего и цилиндрического эпителия шейки матки. Этот краситель позволяет получить более четко и контрастно окрашенные микропрепараты, выявить большее количество нару-

шений и более полно раскрыть их спектр. Различия результатов микроядерного анализа, связанные с использованием того или иного способа окрашивания, необходимо учитывать при проведении скрининговых исследований и при постановке диагноза.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7, 9, 10, 12-16, 29
см. REFERENCES)

1. Короленкова Л. И., Завольская Ж. А., Лешкина Г. В. Новые возможности молекулярного тестирования в цервикальном скрининге и ранней диагностике предрака и рака шейки матки (по материалам клинических рекомендаций «Цервикальная интраэпителиальная неоплазия, эрозия и эктропион шейки матки» Минздрава России от 2020 года). *Медицинский оппонент*. 2020; 3 (11): 12–8.
2. Максимова Д.Ж., Гаппар Г., Зайдин Г., Куандык А., Кулжабеков А., Мыктыбек А. и др. Организация и система скрининговых мероприятий рака шейки матки (обзор литературы). *Medicus*. 2021; 3(39): 15-24.
3. Кiek М.А. К вопросу о ранней диагностике дисплазии и рака шейки матки. *Universum: медицина и фармакология*. 2021; 3-4(76): 4-7. DOI: 10.32743/UniMed.2021.76.3-4.4-7.
4. Игонина С.В., Горшкова А.В., Юминова О.В., Степанова Э.Г., Караваева А.Б., Шишкина В.А. и др. Цитологическое исследование в диагностике предраковых заболеваний шейки матки с позиции доказательной медицины. *Здоровье, демография, экология финно-угорских народов*. 2022; 1: 55-7.
5. Шабалова И.П., Ледина А.В., Созаева Л.Г., Шипулина. О.Ю., Космачёва Н.В., Серегина П.Е. и др. Рак шейки матки в XXI веке: гинеколог, клинический цитолог, специалист по молекулярным исследованиям. *Новости клинической цитологии России*. 2018; 22(3–4): 31-6.
6. Байрамова Г.Р., Баранов И.И., Ежова Л.С., Трофимов Д.Ю., Припутневич Т.В., Амирханян А.С. Плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки: возможности ранней диагностики и тактики ведения пациенток. *Доктор.Ру*. 2019; 11(166): 61-7. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-166-11-61-67.
8. Новик В.И. Скрининг и дифференциальная цитоморфологическая диагностика рака шейки матки. СПб: Ладога; 2012.
11. Цитология жидкостная и традиционная при заболеваниях шейки матки. Цитологический атлас. Шабалова И.П., Касоян К.Т., ред. М.-Тверь: Триада; 2016.
17. Кирьянов Н.А., Суханов С.А. Цитологическая диагностика болезней шейки матки. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2020; 10(3): 95.
18. Толибова Г.Х., Петросян М.А., Полякова В.О., Кветной И. М. Сравнительная оценка эффективности применения традиционной цитологии и автоматизированной жидкостной цитологической технологии NOVAPREP при диагностике предопухольных состояний шейки матки. *Новости клинической цитологии России*. 2012; 16(3-4): 14-7.
19. Рахматулина М.Р., Семенов А.В. Сравнительный анализ методов диагностики и терапии клинических проявлений папилломавирусной инфекции. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2015; 1: 46-53.
20. Кононова И.Н., Башмакова Н.В., Вайнберг Э.И., Ребрикова Л.Н., Борисевич Г.А., Мартемьянова В.В. и др. Оценка дискордантных результатов цитологического исследования цервикального эпителия, обработанного традиционным методом и методом жидкостной цитологии. *Акушерство и гинекология*. 2020; S1: 86-92. DOI: 10.18565/aig.2020.1suppl.86-92.
21. Колмакова Т.С., Белик С.Н., Моргуль Е.В., Севрюков А.В. Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей. Ростов на-Дону : Ростовский государственный медицинский университет; 2013.
22. Калаев В.Н., Артюхов В.Г., Нечаева М.С. Частота встречаемости клеток с морфологически аномальными ядрами в буккальном эпителии человека при разных способах окрашивания. *Цитология*. 2012; 54(1): 78-84.

23. Калаев В. Н., Артюхов В. Г., Нечаева М.С. Микроядерный тест буккального эпителия ротовой полости человека: проблемы, достижения, перспективы. *Цитология и генетика*. 2014; 48(6): 398-414.
24. Юрасова И.В., Соколова Н.В., Нажимов В.П. Проблемы повышения эффективности цитологического исследования аспиратов эндометрия. *Новости клинической цитологии России*. 2015; 19(1-2): 3-7.
25. Новик В.И. Использование анализа микроизображений как метода уточняющей цитологической диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки. *Новости клинической цитологии России*. 2019; 23(2): 12-6.
26. Новик В.И. О методах окраски цитологических препаратов. *Новости клинической цитологии России*. 2017; 21(1-2): 9-10.
27. Полонская Н.Ю., Юрасова И.В. Цитологическое исследование цервикальных мазков – Пап-тест. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
28. Гилл Г.У. Клиническая цитология. Теория и практика цитологии. Пер. с англ. Безруков А.В., Касоян К.Т., ред. М.: Практическая медицина; 2015.
30. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных. М.: ФОРУМ: ИНФРА-М; 2006.

REFERENCES

1. Korolenkova L. I., Zavol'skaya Zh. A., Leshkina G. V. New opportunities for molecular testing in cervical screening and early diagnosis of precancer and cervical cancer (based on the clinical guidelines "Cervical intraepithelial neoplasia, erosion and ectropion of the cervix" of the Ministry of Health of Russia of 2020). *Meditsinskiy opponent*. 2020; 3 (11): 12–8. (in Russian)
2. Maksutova D.Zh., Gappar G., Zaydin G., Kuandyk A., Kulzhabekov A., Myktybek A. et al. Organization and system of screening measures for cervical cancer (review). *Medicus*. 2021; 3(39): 15-24. (in Russian)
3. Kiek M. A. On the issue of early diagnosis of dysplasia and cervical cancer. *Universum: meditsina i farmakologiya*. 2021; 3-4(76): 4-7. DOI 10.32743/UniMed.2021.76.3-4.4-7. (in Russian)
4. Igonina S.V., Gorshkova A.V., Yuminova O.V., Stepanova Ye.G., Karavaeva A.B., Shishkina V.A. et al. Cytological study in the diagnosis of precancerous diseases of the cervix from the standpoint of evidence-based medicine. *Zdorov'e, demografiya, ekologiya finno-ugorskikh narodov*. 2022; 1: 55-7. (in Russian)
5. Shabalova I.P., Ledina A.V., Sozaeva L.G., Shipulina. O.Yu., Kosmachyova N.V., Seregina P.E. et al. Cervical Cancer in the 21st Century: Gynecologist, Clinical Cytologist, Molecular Researcher. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2018; 22(3–4):31-6. (in Russian)
6. Bayramova G.R., Baranov I.I., Ezhova L.S. Trofimov D.Yu., Priputnevich T.V., Amirkhanyan A.S. Squamous intraepithelial lesions of the cervix: the possibility of early diagnosis and management of patients. *Doktor.Ru*. 2019; 11(166): 61-7. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-166-11-61-67. (in Russian)
7. Ince U., Aydin O., Peker O. Clinical importance of «low-grade squamous intraepithelial lesion, cannot exclude high-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL-H)» terminology for cervical smears 5-year analysis of the positive predictive value of LSIL-H compared with ASC-H, LSIL, and HSIL in the detection of high-grade cervical lesions with a review of the literature. *Gynecol. Oncol*. 2011; 121:152-6.
8. Novik V.I. Screening and differential cytomorphological diagnosis of cervical cancer [Skrining i differentsial'naya tsitomorfoloicheskaya diagnostika raka sheyki matki]. St. Petersburg: Ladoga; 2012. (in Russian)
9. Schiffman M., Solomon D. Cervical-cancer screening with human papillomavirus and cytologic contesting. *N. Engl. J. Med*. 2013; 369:2324-31.
10. Cormier K., Schaaf M., Hamilton S., Tickman R.J., Perez-Reyes N., Sturgis C.D. NILM Pap slides from women 30 years of age and older with positive high-risk HPV DNA. Focused rescreening prior to report issuance, an enhancer quality control measure. *Am. J. Clin. Pathol*. 2014; 141: 494-500.

11. Cytology liquid and traditional in diseases of the cervix. Cytological atlas [Tsitologiya zhidkostnaya i traditsionnaya pri zabolevaniyakh sheyki matki. Tsitologicheskiy atlas]. Shabalova I.P., Kasoyan K.T., eds. Moscow- Tver': Triada; 2016. (in Russian)
12. Mulhen E., Amin M., Copeland J., Sharma J., Hunter S. Type-specific human papillomavirus DNA detected in atypical glandular cell Pap tests. *Acta Cytol.* 2012; 56: 155-9.
13. Namugenyi S.B., Balsan J.M., Glick S.N., Jordan J.A. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in cytology specimens containing atypical glandular cells: a casecontrol study. *J. Clin. Virol.* 2013; 58: 432-6.
14. Mody D.R., ed. Glandular cell abnormalities. In: *Diagnostic pathology cytopathology*. Salt Lake City (Utah): Amirsys Publishing Inc.; 2014.
15. Layfield L.J., Pitman M.B., DeMay R.M., Shidham V.B. Pancreaticobiliary tract cytology: journey toward «Bethesda» style guidelines from the Papanicolaou Society of Cytopathology. *CytoJournal.* 2014; 11: 18.
16. Nayar R., Wilbur D.C. The Bethesda system for reporting cervical cytology. In: *Comprehensive cytopathology*. Bibbo M., Wilbur D.C., eds. London: Elsevier; 2015.
17. Kir'yanov N.A., Sukhanov S.A. Cytological diagnosis of diseases of the cervix. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny.* 2020; 10(3): 95. (in Russian)
18. Tolibova G.H., Petrosyan M.A., Polyakova V.O., Kvetnoy I. M. Comparative evaluation of the effectiveness of traditional cytology and NOVAPREP automated liquid cytology technology in the diagnosis of precancerous conditions of the cervix. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2012; 16(3-4): 14-7. (in Russian)
19. Rakhmatulina M.R., Semenenko A.V. Comparative analysis of methods for diagnosing and treating clinical manifestations of papillomavirus infection. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2015; 1: 46-53. (in Russian)
20. Kononova I.N., Bashmakova N.V., Vaynberg Ye.I., Rebrikova L.N., Borisevich G.A., Martem'yanova V.V. et al. Evaluation of discordant results of cytological examination of the cervical epithelium, processed by the traditional method and the method of liquid cytology. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2020; S1: 86-92. DOI: 10.18565/aig.2020.1suppl.86-92. (in Russian)
21. Kolmakova T.S., Belik S.N., Morgul' E.V., Sevryukov A.V. The use of the micronucleus test to evaluate the effectiveness of allergy treatment in children [Ispol'zovanie mikroyadernogo testa dlya otsenki effektivnosti lecheniya allergii u detey]. Rostov-na-Donu: Rostovskiy gosmeduniversitet; 2013. (in Russian)
22. Kalaev V.N., Artyukhov V.G., Nechaeva M.S. The frequency of occurrence of cells with morphologically abnormal nuclei in human buccal epithelium with different staining methods. *Tsitologiya.* 2012; 54(1): 78-84. (in Russian)
23. Kalaev V. N., Artyukhov V. G., Nechaeva M.S. Micronucleus test of the buccal epithelium of the human oral cavity: problems, achievements, prospects. *Tsitologiya i genetika.* 2014; 48(6): 398 – 414. (in Russian)
24. Yurasova I.V., Sokolova N.V., Nazhimov V.P. Problems of increasing the efficiency of cytological examination of endometrial aspirates. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2015; 19(1-2): 3-7. (in Russian)
25. Novik V.I. The use of microimage analysis as a method for clarifying cytological diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia of the cervix. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2019; 23(2): 12-6. (in Russian)
26. Novik V.I. About staining methods for cytological preparations. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2017; 21(1-2): 9-10. (in Russian)
27. Polonskaya N.Yu., Yurasova I.V. Cytological examination of cervical smears – Pap test [Tsitologicheskoe issledovanie tservikal'nykh mazkov – Pap-test]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
28. Gill G.W. Cytopreparation: Principles & Practice. Trans. from Engl. Bezrukov A.V., Kasoyan K.T., eds. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2015. (in Russian)
29. Gill G.W. Gill hematoxylin: first person account. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission.* 2010; 85(1): 7–18. DOI: 10.3109/10520290903048376.
30. Kulaichev A.P. Methods and tools for complex data analysis [Metody i sredstva kompleksnogo analiza dannykh]. Moscow: FORUM; INFRA–M; 2006. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Никольский М.А.¹, Ведерников В.Е.², Вязовая А.А.³, Домонова Э.А.⁴, Лисок А.В.², Лиознов Д.А.^{1,5}

АПРОБАЦИЯ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИРУСОВ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6А И 6В

¹ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

²ГК «Алкор Био», 192148, Санкт-Петербург, Россия;

³ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;

⁵ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, 197376, Санкт-Петербург, Россия

Вирус герпеса человека 6 (ВГЧ-6) с 2012 года подразделяют на два биологических вида – ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Данные о циркуляции этих видов в России ограничены. Целью нашей работы была апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для выявления и видовой дифференциации вирусов герпеса человека 6А и 6В методом ПЦР (ГК «Алкор Био», г. Санкт-Петербург). Изучены образцы биологического материала 239 детей и взрослых с острой и латентной ВГЧ-6А/В-инфекцией и подозрением на хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А/В-статус. Для подтверждения результатов дифференциации использовали параллельное тестирование образцов с помощью двух альтернативных методик и секвенирование. Дополнительно проведена апробация на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В. Видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. Аналитическая специфичность – 100%. Показана 100% сходимость обнаружения и дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, полученных с помощью изучаемого набора реагентов и двух альтернативных референсных систем. Результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру. При тестировании панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В установлено 100% совпадение результатов. Отечественный набор реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР может быть использован как для диагностики, так и в эпидемиологических исследованиях.

Ключевые слова: ВГЧ-6А; ВГЧ-6В; хцВГЧ-6А/В; ВГЧ-6А/В-инфекция; внезапная экзантема; секвенирование.

Для цитирования: Никольский М.А., Ведерников В.Е., Вязовая А.А., Домонова Э.А., Лисок А.В., Лиознов Д.А. Апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для видовой дифференциации вирусов герпеса человека 6А и 6В. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 224-231. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-224-231>

Для корреспонденции: Никольский Михаил Андреевич, врач-педиатр, канд. мед. наук, асс. каф. педиатрии; e-mail: nicolm@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 22.10.2022

Принята к печати 10.03.2023

Опубликовано 00.04.2023

Nikolskiy M.A.¹, Vedernikov V.E.², Vyazovaya A.A.³, Domonova E.A.⁴, Lisok A.V.², Lioznov D.A.^{1,5}

APPROBATION AND PRECLINICAL TRIALS OF RUSSIAN REAGENTS SET FOR SPECIES DIFFERENTIATION OF HUMAN HERPES VIRUSES 6A AND 6B

¹First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, 197022, Saint Petersburg, Russia;

²Alkor Bio Group of Companies, 192148, Saint Petersburg, Russia;

³St. Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint Petersburg, Russia;

⁴Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;

⁵Smorodintsev Research Institute of Influenza, 197376, Saint Petersburg, Russia

Since 2012, human herpes virus 6 (HHV-6) was divided into two different species (HHV-6A and HHV-6B). These variants have various geographical predominance and clinical manifestation, but there is no enough data about prevalence of HHV-6 species in Russia. The aim of our study was to test a novel PCR set of reagents for HHV-6A/B detection and differentiation, designed and manufactured by the “Alkor Bio” company. 239 patients with acute or latent HHV-6A/B-infection or icHHV-6A/B were tested by novel PCR set of reagents and in parallel by two other reference PCR test systems and sequencing. All tested samples were typed as HHV-6B. Novel PCR set of reagents showed 100% analytical specificity and full concordance with two other reference PCR test systems and Sanger sequencing. The novel PCR set of reagents from “Alkor Bio” company for HHV-6A and HHV-6B species detection and differentiation can be used both for diagnostics and in epidemiological studies.

Key words: HHV-6A; HHV-6B; icHHV-6A/B; exanthem subitum; sequencing.

For citation: Nikolskiy M.A., Vedernikov V.E., Vyazovaya A.A., Domonova E.A., Lisok A.V., Lioznov D.A. Approbation and preclinical trials of Russian reagents set for species differentiation of human herpes viruses 6A and 6B. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 224-231 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620-0869-2084-2023-68-4-224-231>

For correspondence: *Nikolskiy Mikhail Andreevich*, pediatrician, PhD, assistant of professor; e-mail: nicolm@inbox.ru

Information about authors:

Nikolskiy M.A., <https://orcid.org/0000-0001-9766-2577>;
Vedernikov V.E., <https://orcid.org/0000-0001-7260-8013>;
Vyazovaya A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9140-8957>;
Domonova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-8262-3938>;
Lisok A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3134-1970>;
Lioznov D.A., <https://orcid.org/0000-0003-3643-7354>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 20.10.2022
Accepted 10.03.2023
Published 00.04.2023

Вирус герпеса человека 6 (ВГЧ-6) идентифицирован в 1986 г. [1]. Уже через несколько лет были выявлены новые штаммы этого же вируса, имеющие значимые молекулярно-биологические отличия. В 1992 г. предложено разделить ВГЧ-6 на два варианта А и В. Эти два варианта *in vitro* демонстрируют различия по тропизму к Т-клеткам, особенностям иммунологического ответа и последовательности ДНК [2, 3]. В виду отсутствия сведений о межвидовой рекомбинации вируса герпеса человека 6А (ВГЧ-6А) и вируса герпеса человека 6В (ВГЧ-6В), сделан вывод, что они занимают разные экологические ниши [4]. Согласно новой международной классификации, принятой в 2012 году, ВГЧ-6А и ВГЧ-6В являются самостоятельными таксономическими единицами [5, 6].

ВГЧ-6А и ВГЧ-6В – ДНК-содержащие вирусы, принадлежащие семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Betaherpesvirinae*, роду *Roseolovirus*. ВГЧ-6А и ВГЧ-6В различаются по последовательности нуклеотидов, особенностям культивирования, эпидемиологическим данным. Нуклеотидные последовательности ВГЧ-6А и ВГЧ-6В совпадают в 75–95% в зависимости от сравниваемого гена. Кроме того, ряд исследований продемонстрировал различия процесса сплайсинга и регуляции транскрипции [7]. Имеют место географические различия в распространенности ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, хотя возможна и одновременная циркуляция обоих видов на одной территории [8, 9].

ВГЧ-6В значительно чаще, чем ВГЧ-6А, вызывает острую инфекцию у детей (внезапная экзантема, лихорадка без сыпи), а также ассоциирован с фебрильными судорогами и височной эпилепсией. К тому же ВГЧ-6В, в отличие от ВГЧ-6А, резистентен к противовирусному действию альфа- и бета-интерферонов [10]. ВГЧ-6А чаще выявляется у взрослых людей с хроническими заболеваниями [11]. Несмотря на то, что оба вируса являются нейротропными, ВГЧ-6А оказывает более серьезное воздействие на организм человека [12] и встречается чаще, чем ВГЧ-6В, при рассеянном склерозе и ромбэнцефалите [13].

В зарубежной литературе представлены данные о способности реактивации обоих вариантов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [14] и органов [15]. Помимо этого, ВГЧ-6А и ВГЧ-

6В могут интегрироваться в субтеломерную/теломерную область хромосом человека и передаваться по наследству (хромосомно-интегрированный ВГЧ-6А (хиВГЧ-6А), хромосомно-интегрированный ВГЧ-6В (хиВГЧ-6В)) [16].

Как ВГЧ-6А, так и ВГЧ-6В, тропны к CD4+ лимфоцитам [17]. В отличие от ВГЧ-6В, ВГЧ-6А способен инфицировать также CD8+ лимфоциты и натуральные киллеры [18]. Кроме того, он успешно реплицируется в нейтральных стволовых клетках, а также в клетках-предшественниках астроцитов и олигодендроцитов [19]. Вирусы используют разные клеточные рецепторы для проникновения: ВГЧ-6А – CD46, ВГЧ-6В – CD134 [20, 21]. Эти различия могут объяснять различную их тропность к тканям и отличающийся спектр патологии.

Таким образом, продолжают накапливаться новые сведения о различиях между ВГЧ-6А и ВГЧ-6В.

На текущий момент используемые традиционные иммунохимические методы, направленные на выявление и количественное определение вирусоспецифических антител, не способны различить ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Для научных целей создана мультиплексная методика, позволяющая провести дифференциацию антител класса G к антигенам ВГЧ-6А и ВГЧ-6В [22]. Но чаще для дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В используются молекулярно-генетические методы: ПЦР и секвенирование (определение последовательностей нуклеотидов нуклеиновой кислоты).

Известен способ дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В (JP2003135100 (A), 2003-05-13) на основе разницы длин амплифицируемых фрагментов для различных подтипов с последующей электрофоретической детекцией. Для анализа выбран ген *U89/90*, отличающийся наличием инсерций размером 108 и 228 п.н. для ВГЧ-6В относительно ВГЧ-6А. Недостатком способа является использование для анализа электрофоретической детекции и варибельность размеров инсерций [23].

Более перспективными для использования являются методики на основе ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов анализа в режиме «реального времени» для которых задача по дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В может быть сведена к определе-

нию однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), позволяющих специфично различать указанные виды.

Потребность в быстрых, производительных, недорогих тестах для анализа ОНП привело к бурному развитию различных методов для дискриминации аллельных вариантов: на основе лигирования [24], масс-спектропии [25]; ДНК-микрочипа [26]; анализа длин рестрикционных фрагментов [27]; зондов типа TaqMan [28]; анализа кривой плавления [29] и др. Наиболее распространенной за счет высокой чувствительности, специфичности и надежности интерпретации результатов является технология TaqMan.

Отсутствие в России зарегистрированных наборов реагентов для дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В до настоящего времени не позволяло изучить соотношение видов в популяции ВГЧ-6.

Целью нашей работы явилась апробация и проведение доклинических испытаний набора реагентов для обнаружения и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В на основе метода ПЦР.

Материал и методы. Разработка набора реагентов осуществлена в ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург. Техническим результатом изобретения является способ определения ВГЧ-6А и ВГЧ-6В на основе технологии TaqMan. При использовании заявленного способа исследования могут проводиться в одной пробирке на амплификаторах с тремя каналами детекции [30]. Определение ВГЧ-6А и ВГЧ-6В осуществляется по фрагменту последовательности гена *U67*, содержащей два ОНП, что позволяет дифференцировать виды. В качестве внутреннего эндогенного контроля используется фрагмент ДНК гена *B2M* (*beta-2-microglobulin*). Амплификация ДНК гена *B2M* не конкурирует с определением ВГЧ-6А, ВГЧ-6В и позволяет по значениям пороговых циклов *Sq* контролировать преаналитический и аналитический этапы исследования. В процессе амплификации происходит специфическое связывание и последующее расщепление соответствующих зондов, в результате чего повышается уровень флуоресценции, который фиксируется детектором амплификатора в режиме «реального времени» одновременно по каналам: HEX – для ВГЧ-6А, ROX – ВГЧ-6В и FAM – *B2M*.

Последовательности специфических праймеров и зондов, используемых для видовой дифференциации вирусов и детекции внутреннего эндогенного контроля описаны в патенте [30].

Состав реакционной смеси (*V*=30 мкл): 50 mM Tris-SO₄, pH 8,0; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 3,5 mM MgCl₂; 30 mM KCl; 0,01 % Tween-20; по 0,25 mM каждого dNTP; по 3 pM праймеров и по 1,5 pM зондов; 2,5 е.а. TaqM ДНК-полимеразы производства ООО «Компания Алкор Био» (Россия) и 5 мкл ДНК выделенной из биологического образца.

Параметры циклирования: «горячий старт» в течение 15 мин при 95°C; 45 циклов в режиме 95°C в течение 10 с, 60°C в течение 20 с с детекцией флуоресцентного сигнала для флуорофоров FAM, HEX и ROX. Постановку ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот «CFX96 Touch» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США, № ФСЗ 2008/03399).

При апробации разработчиками набора реагентов проведено изучение влияния исходной концентрации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в тестируемом образце на получаемые результаты ПЦР-анализа. Исследование проводили с использованием стандартных образцов предприятия (СОП). В качестве высококонцентрированной матрицы использовали СОП с *Sq*=20±2, а низкоконцентрированной – *Sq*=30±2. Для каждой комбинации концентраций ДНК вирусов тестирование проводилось в 8 повторениях. Схема эксперимента представлена в табл. 1.

Аналитическую специфичность оценили при тестировании образцов геномной ДНК человека и панели ДНК следующих микроорганизмов: *Human alphaherpesvirus 1*, *Human alphaherpesvirus 2*, *Human alphaherpesvirus 3*, *Human gammaherpesvirus 4*, *Human betaherpesvirus 5*, *Human betaherpesvirus 7*. Кроме того, оценили *in silico* методом выравнивания последовательности целевого специфического участка с ДНК *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*.

На первом этапе доклинических испытаний разработанного набора реагентов в ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (НИИ-ЭМ им. Пастера) исследованы 239 образцов ДНК, экстрагированных из образцов плазмы (*n*=124) или сыворотки (*n*=40) или лейкоцитов (*n*=5) венозной крови детей с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией, полученных в Детской городской клинической больнице им. Н.Ф. Филатова (ДГКБ № 5), НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой (НИИ ДОГиТ); ногтевых пластин (*n*=22) пациентов с подозрением на хиВГЧ-6А/В-статус, собранных в ДГКБ № 5 и амбулаторно; слюны (*n*=48) детей и взрослых с латентной ВГЧ-6А/В-инфекцией, наблюдавшихся амбулаторно в Санкт-Петербурге.

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Добровольное информированное согласие родителей получали в момент госпитализации ребенка.

Таблица 1

Схема эксперимента по исследованию взаимного ингибирования двух выявляемых специфических мишеней (ДНК ВГЧ-6А и ДНК ВГЧ-6В)

№ образца п/п	ДНК ВГЧ-6А	ДНК ВГЧ-6В
1	Высокая концентрация СОП	Высокая концентрация СОП
2	Высокая концентрация СОП	Низкая концентрация СОП
3	Низкая концентрация СОП	Высокая концентрация СОП
4	Низкая концентрация СОП	Низкая концентрация СОП

На втором этапе работы выполнено параллельное тестирование 120 биологических образцов плазмы венозной крови детей из вышеописанной выборки с выявленным ВГЧ-6А/В с использованием двух альтернативных референсных систем на основе технологии TaqMan: согласно описанию, представленному в патенте CN103820574В к гену *U38* [31] и по J. Yavarian и соавт. [32] к гену *U41*.

Дополнительно, для подтверждения полученных результатов проведено секвенирование по Сэнгеру 49 образцов фрагмента гена *U86* длиной 547 п.н., который идентичен между ВГЧ-6А и ВГЧ-6В менее чем на 70% и у ВГЧ-6А несет делецию длиной 15 п.н. [33]. Результаты секвенирования сравнивались с референсными последовательностями HNV-6А NC_001664 и HNV-6В NC_000898.

На заключительном этапе проведена апробация отечественного набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В, разработанной в отделе молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Контрольная панель включала в себя 12 зашифрованных образцов: 10 положительных и 2 отрицательных. Положительные образцы представляли собой препараты очищенной ДНК клинических изолятов ВГЧ-6А или ВГЧ-6В, выделенных от пациентов с хиВГЧ-6А, хиВГЧ-6В или больных ВЭ. Отрицательные – препараты очищенной ДНК, экстрагированной из биологического материала, не содержащего ВГЧ-6А/В. Все образцы ДНК были выделены с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Количественное определение ДНК ВГЧ-6А/В выполняли методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® HNV6-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Постановку и анализ результатов амплификации проводили на приборе с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» «Rotor-Gene Q», «Qiagen GmbH», Германия). Видовую принадлежность устанавливали на основании анализа данных, полученных методом массового параллельного секвенирования («MiSeq», Illumina, США), описанных ранее [34, 35].

Расшифровку панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В осуществляли в НИИЭМ им. Пастера. Идентификацию ДНК в анализируемых образцах проводили методом ПЦР-РВ с использованием разработанного набора реагентов (ГК «Алкор Био»). Постановку ПЦР проводили на термоциклере для амплификации нуклеиновых кислот «CFX96 Touch» (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Результаты. В ходе апробации разработанного набора реагентов установлено, что видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. На рисунке представлены кривые флуоресценции в соответствии с табл. 1.

При тестировании образцов ДНК человека и панели ДНК 6 микроорганизмов (*Human alphaherpesvirus*

1, *Human alphaherpesvirus 2*, *Human alphaherpesvirus 3*, *Human gammaherpesvirus 4*, *Human betaherpesvirus 5*, *Human betaherpesvirus 7*) неспецифических реакций не обнаружено. По результатам анализа *in silico* отсутствуют неспецифические реакции с ДНК *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma* sp., *Ureaplasma* sp., *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*.

В рамках доклинических испытаний отечественного набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в ДГКБ№ 5 в обследование были включены 166 больных (88 мальчиков, 78 девочек) в возрасте от 9 дней до 33 месяцев жизни (средний возраст – 10,5±0,6 месяцев) с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией.

Проанализированы особенности клинического анализа крови у детей с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией. У большинства обследованных он характеризовался нормальным содержанием лейкоцитов (53,6%) или лейкопенией (20,5%), также была типична нейтропения и/или лимфоцитопения (суммарно 57% больных). Лейкоцитоз не был характерен для острой ВГЧ-6А/В-инфекции и встречался в 4,8% случаях при наличии сопутствующих заболеваний.

На основании выявленных симптомов и данных лабораторного обследования у 150 пациентов был выставлен диагноз внезапной экзантемы (ВЭ). ВЭ была типичной (3-4 суток высокая температура тела с последующим появлением типичной пятнисто-папулезной сыпи) у большинства пациентов (92%). У 8% детей ВЭ была атипичной – сыпь появлялась после однократного подъема температуры тела выше 38° С или через 2-3 дня субфебрильной температуры. Фебрильные судороги на фоне ВЭ были у 13 пациентов (7,8%).

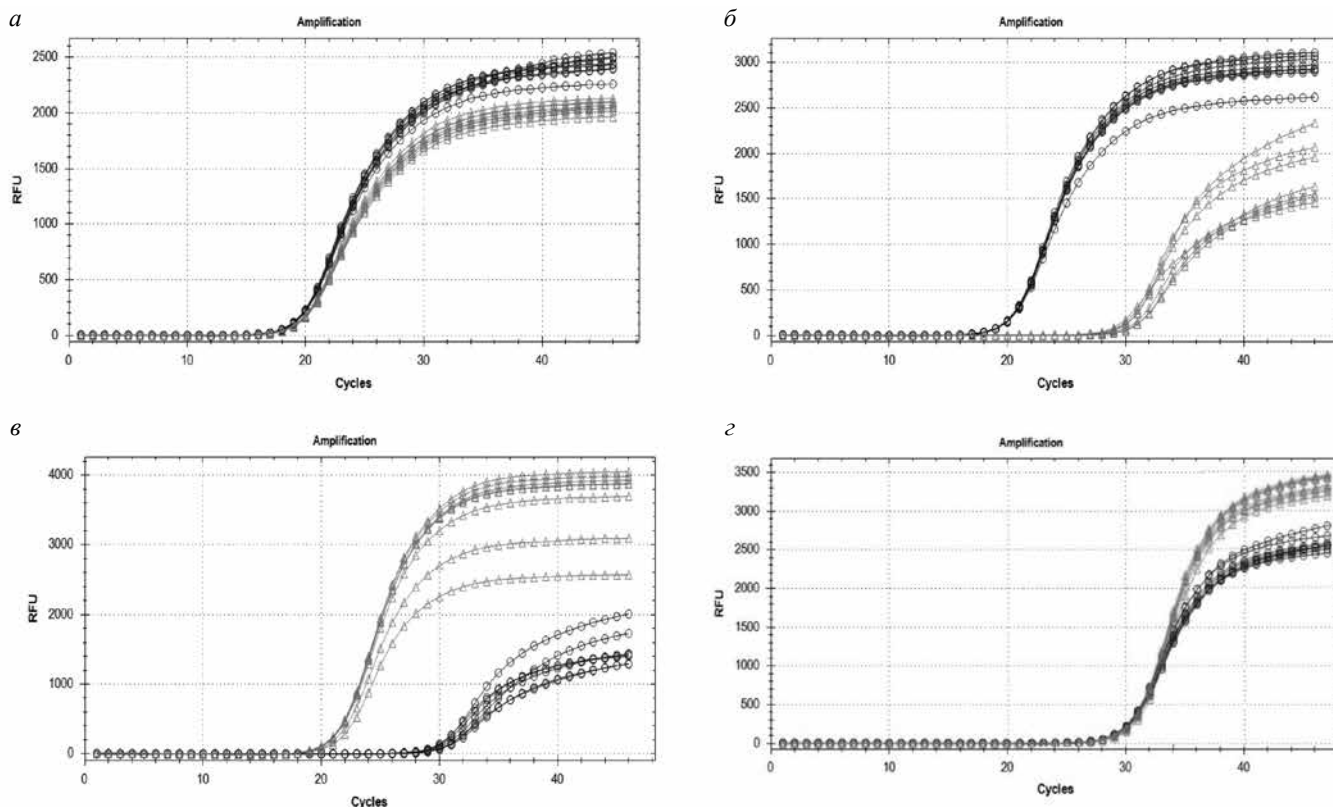
У девяти детей была лихорадка без сыпи (ЛС). ЛС характеризовалась подъемом температуры тела в течение 3-4 суток, но после ее нормализации сыпи не регистрировалось.

У пяти новорожденных детей была сыпь без лихорадки. В двух случаях сыпь была яркой, похожей на многоформную крапивницу, описанной рядом авторов [36] и послужила основной причиной госпитализации, в остальных – пятнисто-папулезной. Сыпь проходила бесследно в течение нескольких дней. У двух обследованных новорожденных детей не было ни лихорадки, ни сыпи.

У трети пациентов с острой ВГЧ-6А/В-инфекцией заболевание манифестировало на фоне острого респираторного заболевания (ОРВИ, бронхиты, бронхиолиты, пневмонии) – 34 пациента (20%), острых кишечных инфекций (в основном ротавирусной природы – 22 пациента (13%)). У 10 пациентов (6%) была клиническая картина мононуклеозоподобного синдрома.

ДНК ВГЧ-6В была определена у всех пациентов (n=166) с ВЭ, ЛС, мононуклеозоподобным синдромом.

Среди пациентов НИИ ДОГиТ острая ВГЧ-6В-инфекция была выявлена у трех детей. Больные были обследованы до и после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в динамике на 14, 28, 30 день (табл. 2).



Кривые флуоресценции при исследовании влияния амплификации ДНК вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В в различной концентрации друг на друга.

а – высокая вирусная нагрузка вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В; б – высокая вирусная нагрузка вируса ВГЧ-6А при низкой ВГЧ-6В; в – высокая вирусная нагрузка вируса ВГЧ-6В при низкой ВГЧ-6А; з – низкая вирусная нагрузка вирусов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В.

Кружками обозначены кривые флуоресценции по каналу HEX (ВГЧ-6А), треугольниками - кривые флуоресценции, соответствующие каналу ROX (ВГЧ-6В).

Таблица 2

Диагнозы и вид ТГСК у пациентов НИИ ДОГиТ

№ п/п	Возраст, годы	Пол	Диагноз	Вид и характеристики ТГСК
1	5 лет	М	Острый миелоидный лейкоз, М5, первично резистентное течение	Аллогенная неродственная КМ* РИК**
2	14 мес	Ж	Врожденный острый лимфобластный лейкоз	Гаплоидентичная КМ МАК**
3	5 лет	М	Вторичный острый миелоидный лейкоз	Аллогенная неродственная КМ МАК

Примечание. * - Источник ТГСК (трансплантации гемопоэтических стволовых клеток) – КМ – костный мозг; ** - различия в режимах кондиционирования – МАК – миелоаблативный, РИК – режим кондиционирования со сниженной токсичностью.

У одного пациента произошла реактивация ВГЧ-6В на 14-й день после ТГСК. Во втором случае острая первичная инфекция, вызванная ВГЧ-6В, зарегистрирована на 24 день. У третьего больного первичная ВГЧ-6В-инфекция выявлена на 30-й день после ТГСК. У всех пациентов после ТГСК клиническими проявлениями острого инфекционного процесса были лихорадка и нейтропения.

В слюне 48 больных (от 1 года жизни до 54 лет), наблюдавшихся у инфекциониста в амбулаторном центре НИИЭМ им. Пастера, был также выделен ВГЧ-6В. Основными причинами обследования на ВГЧ-6А/В пациентов были синдром хронической

усталости, частые и длительные респираторные заболевания, рецидивирующие герпетические инфекции, подозрение на иммунодефицитное состояние.

Кроме этого, ВГЧ-6В был выделен из образцов ногтевых пластин 22 пациентов и их ближайших родственников с подозрением на хиВГЧ-6А/В-статус. Поиск производился как у пациентов ДГКБ № 5 с высокой вирусной нагрузкой в плазме венозной крови, так и у пациентов, обратившихся амбулаторно [37].

Таким образом, во всех 239 образцах биологического материала, исследованных на первом этапе доклинических испытаний разработанного набора реагентов, у детей и взрослых с различными диагнозами, с острой и

Сопоставление результатов тестирования образцов контрольной панели

№ образца п/п	Биологический материал	Заданные параметры (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора)		Полученные результаты (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера)
		Вид микроорганизма	Концентрация, (копий ДНК/мл)	Вид микроорганизма
1	Моча	ВГЧ-6А	2,0x10 ³	ВГЧ-6А
2	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
3	Плазма крови	ВГЧ-6А	3,3x10 ⁴	ВГЧ-6А
4	Плазма крови	ВГЧ-6А	8,5x10 ⁴	ВГЧ-6А
5	Плазма крови	ВГЧ-6А	2,2x10 ⁵	ВГЧ-6А
6	Моча	ВГЧ-6В	6,9x10 ⁴	ВГЧ-6В
7	Моча	ВГЧ-6В	1,6x10 ⁴	ВГЧ-6В
8	Плазма крови	ВГЧ-6А	7,5x10 ³	ВГЧ-6А
9	Плазма крови	ВГЧ-6А	1,7x10 ⁴	ВГЧ-6А
10	Плазма крови	Отсутствует	–	Отсутствует
11	Плазма крови	ВГЧ-6А	3,6x10 ⁴	ВГЧ-6А
12	Плазма крови	ВГЧ-6А	1,6x10 ⁵	ВГЧ-6А

латентной инфекцией, вызванной ВГЧ-6А/В, а также с подозрением на хиВГЧ-6А/В, определен ВГЧ-6В.

Параллельное тестирование 120 образцов, экстрагированных из плазмы венозной крови, с помощью двух альтернативных референсных систем и филогенетический анализ результатов секвенирования по Сэнгеру 49 образцов ДНК подтвердили, что во всех образцах обнаружена ДНК ВГЧ-6В.

Результаты апробации набора реагентов для видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР на панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), полученные на заключительном этапе исследования, представлены в табл. 3. Среди зашифрованных образцов контрольной панели были определены: в двух случаях ДНК ВГЧ-6В, восьми – ДНК ВГЧ-6А, двух – ДНК вирусов не обнаружена. Как видно из табл. 3, расхождений в полученных данных с разработчиком контрольной панели не выявлено.

Обсуждение. До сих пор значительное число представленных эпидемиологических и клинических исследований не разграничивают ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, что ведет к получению недостоверных данных об этих различных уникальных видах.

В клинической практике определение видов ВГЧ-6А и ВГЧ-6В важно. Например, показано, что выявление ВГЧ-6А чаще всего свидетельствует о наследуемой хромосомной интеграции – хиВГЧ-6А–статусе пациента, не требующем назначения противовирусной терапии [38].

Существуют только единичные отечественные исследования, посвященные изучению ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. Так, при обследовании в Московском регионе образцов крови 59 детей в возрасте от 1 года до 10 лет с установленной инфекцией, вызванной ВГЧ-6А/В (клинически здоровыми были 14 человек, с проявлениями острой респираторной инфекции – 45) у

27 (46%) детей был выявлен ВГЧ-6А, ВГЧ-6В – у 31 (53%), у одного пациента вид не определен [39]. Для видовой дифференциации использована методика, описанная J.Yavarian и соавт. [32].

В других исследованиях определение уникального вида ВГЧ-6А или ВГЧ-6В у пациентов с хиВГЧ-6А/В–статусом осуществлялось при использовании метода массового параллельного секвенирования [34, 35, 40] с целью последующего филогенетического анализа. Однако данный метод дорог и не доступен для рутинной клинической практики.

В соответствии с полученным нами в ходе апробации и доклинического испытания разработанного набора реагентов результатами ВГЧ-6В превалирует у детей с ВГЧ-6А/В–инфекцией в Санкт-Петербурге. Изучаемый набор реагентов, разработанный ГК «Алкор Био» (Санкт-Петербург) позволил в кратчайшие сроки провести дифференцировку уникальных видов ВГЧ-6А/В в условиях стандартной ПЦР-лаборатории.

Выводы

1. Проведены апробация и доклинические испытания отечественного набора реагентов для обнаружения и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР (ГК «Алкор Био», Санкт-Петербург) в различном биологическом материале (плазма, сыворотка, лейкоциты крови; слюна, ногтевые пластины, моча).

2. Установлено, что видовая дифференциация ВГЧ-6А и ВГЧ-6В при использовании разработанного набора реагентов происходит независимо от исходных концентраций ДНК вирусов в исследуемом образце. Аналитическая специфичность – 100%.

3. Показана 100% сходимость обнаружения и дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В, полученных с помощью изучаемого набора реагентов и двух альтернативных референсных систем. Результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

4. Разработанный набор реагентов позволил провести идентификацию ДНК ВГЧ-6А и ВГЧ-6В и показал 100% совпадение результатов при тестировании панели контрольных образцов ДНК ВГЧ-6А/В (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва).

5. Отечественный набор реагентов для выявления и видовой дифференциации ВГЧ-6А и ВГЧ-6В методом ПЦР может быть использован как для диагностики, так и в эпидемиологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S. F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596–601.
2. Wyatt L.S., Balachandran N., Frenkel N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J. Infect. Dis.* 1990; 162(4):852–7.
3. Ablashi D.V., Balachandran N., Josephs S.F., Hung C.L., Krueger G.R., Kramarsky B. et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 1991; 184(2):545–52.
4. Ablashi D., Agut H., Berneman Z., Campadelli-Fiume G., Carrigan D., Ceccerini-Nelli L. et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch. Virol.* 1993; 129(1):363–6.
5. Davison A., Pellett P., Stewart J. Rename species in the family *Herpesviridae* to incorporate a subfamily designation. *ICTVonline*. Code assigned: 2015.010aD.
6. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* 2014 May; 159(5):863-70.
7. Dominguez G., Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73(10):8040–52.
8. Bates M., Monze M., Bima H., Kapambwe M., Clark D., Kasolo F.C. et al. Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J. Med. Virol.* 2009; 81(5):779–89.
9. Leibovitch E.C., Brunetto G.S., Caruso B. Coinfection of Human Herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as Demonstrated by Novel Digital Droplet PCR Assay. *PLoS One*. 2014; 9(3):1-12.
10. Jaworska J., Gravel A., Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107:8369–74.
11. Flamand L., Lautenschlager I., Krueger G., Ablashi D. Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7. *Diagnosis and Clinical Management*. 3rd ed. Elsevier UK; 2014.
12. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Long C., Epstein L.G., Insel R.A. et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26(1):132–7.
13. Alvarez-Lafuente R., De Las Heras V., Bartolome M., Picazo J.J., Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch. Neurol.* 2004; 61(10):1523–7.
14. Chapenko S., Trociukas I., Donina S., Chistyakov M., Sultanova A., Gravelina S. et al. Relationship between beta-herpesviruses reactivation and development of complications after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J. Med. Virol.* 2012; 84(12):1953–60.
15. Cone R.W., Huang M.L., Hackman R.C., Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(4):877–81.
16. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V. et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(3): 144–55.
17. Nastke M.D., Becerra A., Yin L., Dominguez-Amoroch O., Gibson L., Stern L.J. et al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J. Virol.* 2012; 86:4776–92.
18. De Filippis L., Foglieni C., Silva S., Vescovi A.L., Lusso P., Malnati M.S. Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2006; 37(Suppl. 1):27–32.
19. Gu B., Zhang G.F., Li L.Y., Zhou F., Feng D.J., Ding C.L. et al. Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol. J.* 2011; 8:530.
20. Mori Y., Seya T., Huang H.L., Akkapaiboon P., Dhepakson P., Yamanishi K. et al. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 2002; 76:6750–61.
21. Tang H., Serada S., Kawabata A., Ota M., Hayashi E., Naka T. et al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110:9096–9.
22. Engdahl E., Gustafsson R., Huang J., Biström M., Lima Bomfim I., Stridh P. et al. Increased Serological Response Against Human Herpesvirus 6A Is Associated With Risk for Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 2019; 10:2715.
23. <https://patents.google.com/patent/JP2003135100A/en?q=JP2003135100>
24. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L.A. A Ligase-Mediated Gene Detection Technique. *Science*. 1988; 241:1077-80.
25. Griffin T. J., Hall J.G., Prudent J.R., Smith L.M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 25: 6301-6.
26. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Berno A., Young P., Sapolsky R. et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. 1998; 280:1077-82.
27. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-4.
28. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995; 4: 357-62.
29. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 1997; 245:154-60.
30. Ведерников В.Е., Никольский М.А., Вязовая А.А., Лиознов Д.А., Нарвская О.В. Способ идентификации вариантов А и В вируса герпеса человека 6-го типа. Патент РФ № 2627607; 2017. <https://patents.google.com/patent/CN103820574B/en>.
32. Yavarian J., Shatizadeh Malekshahi S., Yavarian R., Yazdani S., Janani L. et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. *BMC Psychiatry*. 2015 Nov 20; 15:296.
33. Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M., Chen J., Mori Y. et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 1999; 73(10):8053–63.
34. Мелехина Е.В., Домонова Э.А., Гоптарь И.А., Шипулина О.Ю., Горелов А.В. Первый в России случай наследственной передачи хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В (Human betaherpesvirus 6В). *Вопросы практической педиатрии*. 2019; 14(1):33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40.
35. Домонова Э.А., Сильвейстрова О.Ю., Гоптарь И.А., Кулешов К.В., Пасхина И.Н., Никифорова А.В. и др. Первый случай выявления и лабораторного подтверждения наследственной передачи хромосомно-интегрированного Human betaherpesvirus 6A в Российской Федерации. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(3): 5–14. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14.
36. Borghesi A., Cipelletti P., Maragliano R., Manzoni P., Stronati M. Human herpesvirus-6 associated neonatal urticaria multiforme. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 2012; 98(5): F450.
37. Никольский М.А., Вязовая А.А., Лиознов Д.А., Нарвская О.В., Смирнова Н.Н. Случай хромосомно-интегрированного вируса герпеса человека 6В типа у часто длительно болеющего ребенка. *Журнал Инфектологии*. 2020; 12(4):105-8.
38. Ar buckle J.H., Medveczky P.G. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* 2011; 13(9): 731–41.
39. Мелехина Е.В., Лысенкова М.Ю., Свитич О.А., Музыка А.Д., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н. и др. Особенности течения инфекции ВГЧ-6А и ВГЧ-6В у детей, проживающих в Московском регионе. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; (2):42–9.

40. Викулов Г.Х., Домонова Э.А., Мелехина Е.В., Сильвейстрова О.Ю., Кулешов К.В. Наследуемая хромосомная интеграция *Human betaherpesvirus 6B* у женщины с сочетанной герпесвирусной инфекцией, протекающей на фоне вторичной иммунной недостаточности. *Инфекционные болезни*. 2020; 18(4): 182–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-182-188.

REFERENCES

1. Salahuddin S.Z., Ablashi D.V., Markham P.D., Josephs S. F., Sturzenegger S., Kaplan M. et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science*. 1986; 234(4776):596–601.
2. Wyatt L.S., Balachandran N., Frenkel N. Variations in the replication and antigenic properties of human herpesvirus 6 strains. *J. Infect. Dis.* 1990; 162(4):852–7.
3. Ablashi D.V., Balachandran N., Josephs S.F., Hung C.L., Krueger G.R., Kramarsky B. et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology*. 1991; 184(2):545–52.
4. Ablashi D., Agut H., Berneman Z., Campadelli-Fiume G., Carrigan D., Ceccerini-Nelli L. et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch. Virol.* 1993; 129(1):363–6.
5. Davison A., Pellett P., Stewart J. Rename species in the family *Herpesviridae* to incorporate a subfamily designation. *ICTVonline*. Code assigned: 2015.010ad.
6. Ablashi D., Agut H., Alvarez-Lafuente R., Clark D.A., Dewhurst S., DiLuca D. et al. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* 2014 May; 159(5):863–70.
7. Dominguez G., Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J. Virol.* 1999; 73(10):8040–52.
8. Bates M., Monze M., Bima H., Kapambwe M., Clark D., Kasolo F.C. et al. Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa. *J. Med. Virol.* 2009; 81(5):779–89.
9. Leibovitch E.C., Brunetto G.S., Caruso B. Coinfection of Human Herpesviruses 6A (HHV-6A) and HHV-6B as Demonstrated by Novel Digital Droplet PCR Assay. *PLoS One*. 2014; 9(3):1–12.
10. Jaworska J., Gravel A., Flamand L. Divergent susceptibilities of human herpesvirus 6 variants to type I interferons. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2010; 107:8369–74.
11. Flamand L., Lautenschlager I., Krueger G., Ablashi D. Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B, and HHV-7. Diagnosis and Clinical Management. 3rd ed. *Elsevier UK*; 2014.
12. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K.C., Long C., Epstein L.G., Insel R.A. et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26(1):132–7.
13. Alvarez-Lafuente R., De Las Heras V., Bartolome M., Picazo J.J., Arroyo R. Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Arch. Neurol.* 2004; 61(10):1523–7.
14. Chapenko S., Trociukas I., Donina S., Chistyakov M., Sultanova A., Gravelina S. et al. Relationship between beta-herpesviruses reactivation and development of complications after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *J. Med. Virol.* 2012; 84(12):1953–60.
15. Cone R.W., Huang M.L., Hackman R.C., Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(4):877–81.
16. Pellett P.E., Ablashi D.V., Ambros P.F., Agut H., Caserta M.T., Descamps V. et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers. *Rev. Med. Virol.* 2012; 22(3) 144–55.
17. Nastke M.D., Becerra A., Yin L., Dominguez-Amoroch O., Gibson L., Stern L.J. al. Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J. Virol.* 2012; 86:4776–92.
18. De Filippis L., Foglieni C., Silva S., Vescovi A.L., Lusso P., Malnati M.S. Differentiated human neural stem cells: a new ex vivo model to study HHV-6 infection of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2006; 37(Suppl.1):27–32.
19. Gu B., Zhang G.F., Li L.Y., Zhou F., Feng D.J., Ding C.L. et al. Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virol. J.* 2011; 8:530.
20. Mori Y., Seya T., Huang H.L., Akkapaiboon P., Dhepakson P., Yamanihi K. et al. Human herpesvirus 6 variant A but not variant B induces fusion from without in a variety of human cells through a human herpesvirus 6 entry receptor, CD46. *J. Virol.* 2002; 76:6750–61.
21. Tang H., Serada S., Kawabata A., Ota M., Hayashi E., Naka T. al. CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110:9096–9.
22. Engdahl E., Gustafsson R., Huang J., Biström M., Lima Bomfim I., Stridh P. et al. Increased serological response against herpesvirus 6A is associated with risk for multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 2019; 10:2715.
23. <https://patents.google.com/patent/JP2003135100A/en?q=JP2003135100>.
24. Landegren U., Kaiser R., Sanders J., Hood L.A. A Ligase-Mediated Gene Detection Technique. *Science*. 1988; 241:1077–80.
25. Griffin T. J., Hall J.G., Prudent J.R., Smith L.M. Direct genetic analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 25:6301–6.
26. Wang D.G., Fan J.B., Siao C.J., Bero A., Young P., Sapolsky R. et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. 1998; 280:1077–82.
27. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350–4.
28. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR Methods. Appl.* 1995; 4:357–62.
29. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal. Biochem.* 1997; 245:154–60.
30. Vedernikov V.E., Nikolskiy M.A., Vyazovaya A.A., Lioznov D.A., Narvskaya O.V. Identification method for a and b versions of human herpes virus 6. Patent RF № 2627607; 2017. (in Russian)
31. <https://patents.google.com/patent/CN103820574B/en>.
32. Yavarian J., Shatizadeh Malekshahi S., Yavarian R., Yazdani S., Janani L. et al. Type specific Real time PCR for detection of human herpes virus 6 in schizophrenia and bipolar patients: a case control study. *BMC Psychiatry*. 2015 Nov 20; 15:296.
33. Isegawa Y., Mukai T., Nakano K., Kagawa M., Chen J., Mori Y. et al. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J. Virol.* 1999; 73(10):8053–63.
34. Melekhina E. V., Domonova E. A., Goptar' I. A., Shipulina O.Y., Gorelov A.V. First verified case of hereditary transmission of chromosomally integrated Human betaherpesvirus 6B. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2019; 14 (1):33–40. DOI: 10.20953/1817-7646-2019-1-33-40. (in Russian)
35. Domonova E.A., Sil'veystrova O.Yu., Goptar' I.A., Kuleshov K.V., Pashkina I.N., Nikiforova A.V. First laboratory confirmed case of hereditary transmission of chromosomally integrated human betaherpesvirus 6A in the Russian Federation. *Infektsionnye bolezni*. 2019; 17(3): 5–14. DOI: 10.20953/1729-9225-2019-3-5-14. (in Russian)
36. Borghesi A., Cipelletti P., Maragliano R., Manzoni P., Stronati M. Human herpesvirus-6 associated neonatal urticaria multiforme. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*. 2012; 98(5): F450.
37. Nikolskiy M.A., Vyazovaya A.A., Lioznov D.A., Narvskaya O.V., Smirnova N.N. The case of inherited chromosomal integrated human herpes virus type 6b in child with recurrent respiratory tract infections. *Zhurnal Infektologii*. 2020; 12(4):105–8. (in Russian)
38. Arbuckle J.H., Medveczky P.G. The molecular biology of human herpesvirus-6 latency and telomere integration. *Microbes Infect.* 2011; 13 (9): 731–41.
39. Melekhina E.Y., Lyseukova M. Yu., Svitich O.A., Muzyka A.D., Karazhas N.V., Rybalkina T.N. et al. Features of HHV-6A and HHV-6B infections in children living in the Moscow region. *Epidemiologiya I infektsionnye bolezni. Aktual' nye voprosy*. 2018; (2):42–9. (in Russian)
40. Vikulov G.K., Domonova E.A., Melekhina E.V., Sil'veystrova O.Yu., Kuleshov K.V. Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6B in a woman with herpesvirus infection and secondary immune deficiency. *Infektsionnye bolezni*. 2020; 18(4): 182–8. DOI: 10.20953/1729-9225-2020-4-182-188. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ДОМИНИРУЮЩИХ РОДОВ РЕЗИДЕНТНОГО МИКРОБИОМА ОПУХОЛЕЙ ПОЧКИ

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

*Исследование посвящено изучению клинической значимости резидентного микробиома опухолей почки различных гистологических типов. С помощью метагеномного секвенирования проведен анализ 30 образцов почечно-клеточного рака. Выявлено 8 типов и 94 рода микроорганизмов. Наибольшее число выявленных таксонов наблюдали в образцах папиллярного рака почки. Статистически значимое различие отмечено только для бактерий рода *Phyllobacterium*, относительное содержание которых более 1% имело тенденцию к благоприятному прогнозу заболевания в случае папиллярных опухолей. Дополнительно проведен корреляционный анализ между содержанием 20 доминирующих родов бактерий и клиническими характеристиками опухоли. Показано, что для светлоклеточного почечно-клеточного рака содержание бактерий рода *Staphylococcus* прямо коррелировало с экспрессией iNOS и общей выживаемостью пациентов. Полученные данные могут указывать на благоприятное влияние опухоль-специфического воспаления в прогнозе светлоклеточного почечно-клеточного рака и необходимость учитывать данные факторы при персонализированном подходе к проведению терапии.*

Ключевые слова: почечно-клеточный рак; микробиом; клиническая значимость; прогноз.

Для цитирования: Ковалева О.В., Кушлинский Н.Е., Подлесная П.А., Грачев А.Н. Клиническая значимость доминирующих родов резидентного микробиома опухолей почки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 232-236. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-232-236>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00082, <https://rscf.ru/project/22-25-00082/>.

Поступила 17.08.2022

Принята к печати 21.02.2023

Опубликовано 00.04.2023

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

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE DOMINANT GENUS OF RESIDENT RENAL CANCER MICROBIOME

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of the Russian Federation, 115522, Moscow, Russia

*The study is devoted to the research of the clinical significance of the resident microbiome of kidney tumors of various histological types. Using metagenomic sequencing, 30 samples of renal cell carcinoma were analyzed. 8 types and 94 genera of microorganisms were identified. The largest number of identified taxa was observed in samples of papillary kidney cancer. A statistically significant difference was established only for bacteria of the *Phyllobacterium* genus, the relative content of which was more than 1%, which tended to lead to a favorable disease prognosis in the case of papillary tumors. Additionally, a correlation analysis was carried out between the content of 20 dominant genera of bacteria and the clinical characteristics of the tumor. We demonstrated that for clear cell renal cell carcinoma, the content of bacteria of the genus *Staphylococcus* directly correlated with the expression of iNOS and the overall survival of patients. The data obtained may indicate a favorable effect of tumor-specific inflammation in the prognosis of clear cell renal cell carcinoma and the need to take these factors into account in a personalized approach to therapy.*

Key words: renal cell carcinoma; microbiome; clinical relevance; prognosis.

For citation: Kovaleva O.V., Kushlinskii N.E., Podlesnaya P.A., Gratchev A.N. Diagnostic and prognostic potential of the resident non-small cell lung cancer microbiome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 232-236 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-232-236>

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>;

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. 22-15-00082, <https://rscf.ru/project/22-15-00082/>.

Received 17.08.2022

Accepted 21.02.2023

Published 00.04.2023

Введение. С появлением данных о присутствии микроорганизмов в различных тканях и органах человека, наряду с доказанной ролью микробиома кишечника и *H. pylori* в патогенезе онкологических заболеваний, роль микробиома в процессе развития и прогрессии опухоли активно изучается. Стоит отметить, что воздействие микробиома может быть как прямым, так и опосредованным. Под прямым воздействием подразумевается прямой контакт бактерий с опухолевыми клетками или клетками микроокружения. Опосредованным считается, например, влияние кишечного микробиома на опухоль другой локализации. Про опосредованные аспекты микробного влияния известно относительно много, особенно в контексте иммунотерапии [1, 2], однако механизмы этого эффекта охарактеризованы не полностью. Для некоторых опухолей описан также резидентный тканевый микробиом. Имеются работы, в которых показано, что состав резидентного микробиома можно использовать в качестве потенциального клинического, диагностического и прогностического маркеров в случаях некоторых опухолей [3, 4]. Для почечно-клеточного рака (ПКР) роль резидентного микробиома в патогенезе заболевания еще не определена и недостаточно описана. В зависимости от своего качественного и количественного состава, резидентный микробиом может оказывать влияние непосредственно как на опухолевые клетки, так и на клетки опухолевого микроокружения, активируя их цитотоксический фенотип и повышая, тем самым, общий воспалительный фон. Является ли этот факт благоприятным в прогнозе течения заболевания, или наоборот носит отрицательный характер, еще предстоит установить. Например, показано, что клетки первичной опухоли для облегчения процесса метастазирования снижают экспрессию провоспалительных молекул [5], что позволяет предположить благоприятную прогностическую роль ло-

кального внутриопухолевого воспаления. Ранее нами показано, что бактериальная нагрузка опухоли может иметь благоприятное прогностическое значение при высокой экспрессии iNOS опухолевыми клетками немелкоклеточного рака легкого [6]. Для ПКР данных о взаимосвязи экспрессии iNOS опухолевыми клетками и микробиологическим сообществом опухоли не представлено. В целом, работ по изучению резидентного микробиома почки представлено крайне мало, что подтверждает актуальность данного исследования. Целью данной работы является изучение клинической и прогностической значимости доминирующих родов резидентных бактерий опухолей почки различных гистологических типов и оценка перспективы использования их анализа в мониторинге заболевания.

Материал и методы. В исследование включены образцы опухолей в виде парафиновых блоков от 30 пациентов с ПКР различных гистологических типов, полученных от пациентов, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных 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 пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей почки (ВОЗ, 2016). Описание исследованной выборки представлено в табл. 1.

Оценку опухоль-ассоциированного воспаления проводили методом иммуногистохимии по стандартной методике с использованием антител к anti-iNOS (clone SP126; Sigma-Aldrich, USA).

ДНК библиотеки для секвенирования гена 16S были приготовлены 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).

При проведении исследования на каждом этапе были использованы соответствующие отрицательные контроли (в том числе, парафин, воздух и инструменты) для выявления и предотвращения возможной контаминации.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prism 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия

Таблица 1

Клинико-морфологические характеристики больных ПКР

Показатели	Число случаев, абс(%)
Возраст, годы (среднее±SD)	60,2±11,2
Пол:	
Мужчины	16 (53)
Женщины	14 (47)
Гистология:	
скПКР	10 (33,3)
папПКР	10 (33,3)
хрПКР	10 (33,3)
Стадия:	
I-II	19 (63)
III-IV	11 (37)
Размер опухоли:	
T1-T2	16 (53)
T3-T4	14 (47)
Наличие регионарных метастазов (N):	
N0	29 (97)
N+	1 (3)
Выживаемость, месяцы (среднее±SD)	69,14±38,6

и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ состава микробного сообщества опухолей почки различных гистологических типов проведен посредством метагеномного секвенирования. В состав выборки для проведения секвенирования входило 10 образцов светлоклеточного ПКР (скПКР), 10 образцов папиллярного ПКР (папПКР) и 10 образцов хромофобного ПКР (хрПКР). Анализ таксономического состава микробного сообщества тканей опухолей почки выявил наличие 8 типов и 94 родов.

Стоит отметить, что различные гистологические типы отличались по количеству выявленных типов микроорганизмов. Так, наибольшее число типов было выявлено в образцах скПКР и папПКР, в то время как наименьшее число типов в образцах хрПКР. Самыми распространенными типами выявленных микроорганизмов во всех вариантах опухолей почки были *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*.

Показано, что различные гистологические типы опухолей отличались по своему таксономическому разнообразию на уровне родов. Наибольшее число таксонов было выявлено в образцах папиллярного рака, в то время как наименьшее в образцах хрПКР. Для проведения дальнейшего анализа были выбраны по 20 доминирующих родов, характерных для каждого гистологического типа опухоли. Данные представлены в табл. 2.

Как видно из представленных данных, различные гистологические типы опухолей почки отличаются по составу резидентного микробиома, однако статистически значимые различия наблюдали только для бактерий рода *Phyllobacterium*, наибольшее содержание которых характерно для папиллярных опухолей. Данные представлены на рисунке, а, б.

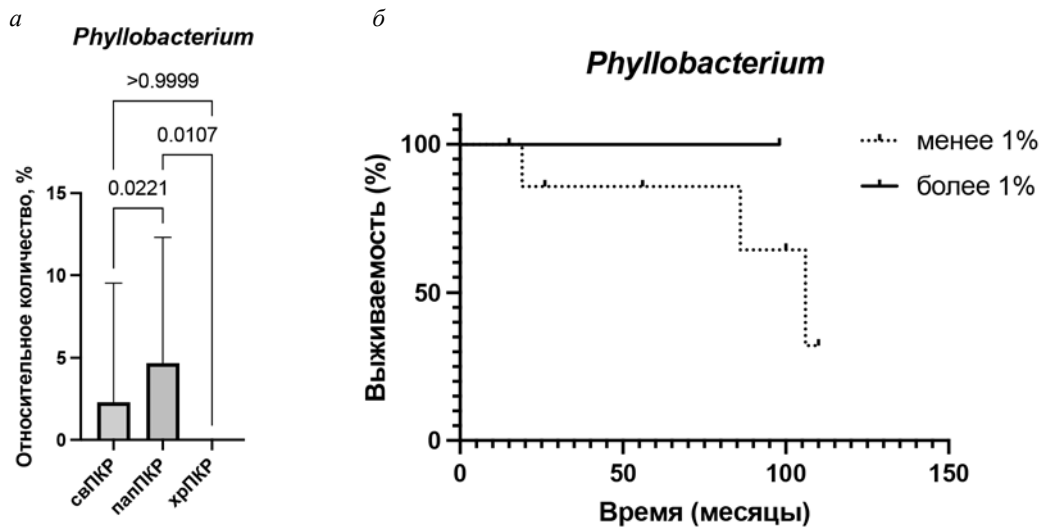
Показано, что высокое содержание бактерий рода *Phyllobacterium* ассоциировано с более благоприятным прогнозом заболевания, однако данные не достигли статистической значимости и требуют подтверждения на более широкой выборке. Однако выявленная закономерность, безусловно, заслуживает внимания при разработке дополнительных инструментов дифференциальной диагностики и прогностических критериев.

На следующем этапе работы провели анализ оценки опухоль-ассоциированного воспаления путем оценки экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в опухолевых клетках методом иммуногистохимии. Экспрессию iNOS выявили в 5-ти исследованных образцах, из которых 3 относились к группе папиллярных и 2 к группе светлоклеточных опухолей. Индуцибельная NO-синтаза (iNOS) является одним из ферментов, который регулирует превращение аминокислоты L-аргинина в эндогенный оксид азота (NO). Функция NO в канцерогенезе многогранна, поскольку он может как способствовать, так и препятствовать прогрессии опухолей в зависимости от раз-

Таблица 2

Доминирующие роды резидентного микробиома опухолей почки различных гистологических типов

Светлоклеточный ПКР		Папиллярный ПКР		Хромофобный ПКР	
Род	%	Род	%	Род	%
<i>Cutibacterium</i>	10,90	<i>Cutibacterium</i>	13,52	<i>Escherichia_Shigella</i>	14,28
<i>Sphingomonas</i>	7,57	<i>Corynebacterium</i>	9,16	<i>Novosphingobium</i>	12,35
<i>Roseomonas</i>	6,33	<i>Escherichia_Shigella</i>	5,95	<i>Cutibacterium</i>	9,22
<i>Staphylococcus</i>	5,91	<i>Clavibacter</i>	5,41	<i>Psychrobacter</i>	7,14
<i>Mesomycoplasma</i>	4,82	<i>Enhydrobacter</i>	4,50	<i>Lactococcus</i>	5,44
<i>Massilia</i>	4,54	<i>Phyllobacterium</i>	3,97	<i>Acinetobacter</i>	4,75
<i>Escherichia_Shigella</i>	4,34	<i>Mesomycoplasma</i>	3,62	<i>Jeotgalicoccus</i>	4,50
<i>Photobacterium</i>	4,29	<i>Simplicispira</i>	2,75	<i>Corynebacterium</i>	4,19
<i>Lawsonella</i>	4,15	<i>Croceibacterium</i>	2,69	<i>Micrococcus</i>	3,15
<i>Blastocatella</i>	4,15	<i>Pseudomonas</i>	2,51	<i>Brachybacterium</i>	2,77
<i>Streptococcus</i>	3,86	<i>Catonella</i>	1,55	<i>Sphingomonas</i>	2,24
<i>Paracoccus</i>	3,24	<i>Lactococcus</i>	1,53	<i>Tetragenococcus</i>	2,20
<i>Anaerobutyricum</i>	2,97	<i>Pedobacter</i>	1,32	<i>Dermabacter</i>	2,18
<i>Aquicella</i>	2,75	<i>Paracoccus</i>	1,02	<i>Cloacibacterium</i>	1,84
<i>Acinetobacter</i>	2,64	<i>Brevundimonas</i>	1,01	<i>Rothia</i>	1,47
<i>Pseudomonas</i>	2,42	<i>Caulobacter</i>	1,00	<i>Aureimonas</i>	1,28
<i>Simplicispira</i>	2,40	<i>Sphingomonas</i>	1,00	<i>Lactobacillus</i>	1,17
<i>Phyllobacterium</i>	2,25	<i>Streptococcus</i>	0,73	<i>Kocuria</i>	0,95
<i>Neisseria</i>	1,86	<i>Acinetobacter</i>	0,62	<i>Massilia</i>	0,87
<i>Rothia</i>	1,46	<i>Nocardioides</i>	0,51	<i>Brevundimonas</i>	0,69



Сравнительный анализ относительного количества бактерий рода *Phyllobacterium* (а) и анализ их прогностической значимости при папиллярном ПКР (б).

личных условий. Ввиду наличия тесной связи между процессами хронического воспаления и развития онкологических заболеваний, роль iNOS активно исследуют в контексте канцерогенеза. Показано, что повышенная экспрессия iNOS ассоциирована с ангиогенезом, устойчивостью к химиотерапии, метастазированием и иммунной резистентностью некоторых злокачественных опухолей. Такая связь обнаружена при колоректальном раке, раке молочной железы, мочевого пузыря, желудка и меланоме [7-10]. Кроме того, в ряде исследований показано, что экспрессия iNOS коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания [11-13], однако в целом прогностическое значение экспрессии данного белка в опухолях остается противоречивым. Например, для колоректального рака показано, что экспрессия iNOS ассоциирована с благоприятным прогнозом заболевания [14]. Для ПКР практически нет опубликованных данных о прогностической значимости данного белка в опухолевых клетках, и в проведенном нами исследовании он был использован в качестве маркера воспаления.

Далее мы провели корреляционный анализ между относительным содержанием бактерий 20 доминирующих родов и клинико-морфологическими характеристиками опухоли для каждого гистологического типа ПКР. Для хрПКР и папПКР не выявлено закономерностей между содержанием бактерий определенных родов и клинико-морфологическими характеристиками опухоли. В случае скПКР показано, что содержание бактерий рода *Rothia* обратно коррелировало с размером опухоли ($r=-0,643$; $p=0,033$). Интересные закономерности выявлены для бактерий рода *Staphylococcus*, а именно: их содержание прямо коррелировало с экспрессией iNOS ($r=0,649$; $p=0,05$) и общей выживаемостью пациентов ($r=0,750$; $p=0,044$). Из литературных данных известно, что бактерии рода *Staphylococcus* могут индуцировать экспрессию iNOS [15]. Также на клетках почечной карциномы показано, что повышение экспрессии iNOS характеризуется противоопухолевыми свойствами, а именно ингиби-

рованием их пролиферации [16]. Полученные нами данные косвенно указывают на благоприятное влияние опухоль-специфического воспаления, вызванного резидентным опухолевым микробиомом на прогноз скПКР. Известно, что различные гистологические типы ПКР прогностически отличаются. Так наиболее прогностически неблагоприятным типом опухоли является скПКР, в то время как хрПКР отличается более благоприятным прогнозом [17]. Выявленные в данном исследовании закономерности, наблюдали именно в случае светлоклеточного варианта ПКР, что в перспективе может иметь клиническое значение для мониторинга динамики развития заболевания и разработки новых подходов к терапии.

Заключение. Данное исследование продемонстрировало, что различные гистологические типы почечно-клеточного рака различаются по таксономическому составу резидентного микробиома, и для некоторых типов опухолей это может иметь определенную прогностическую значимость. Помимо этого, для комплексного анализа стромы опухоли необходимо учитывать уровень локального воспаления, так как этот факт в совокупности с другими особенностями может также иметь прогностическую ценность и определить стратегию дальнейшей терапии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-17 см. REFERENCES)

5. Дерягина В.П., Рыжова Н.И., Кривошеева Л.В., Голубева И.С., Савлущинская Л.А., Хоченков Д.А. Экспрессия iNOS и биосинтез метаболитов оксида азота при росте опухолей различного гистогенеза. *Успехи молекулярной онкологии*. 2016; 3 (3): 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80.

REFERENCES

1. Frankel A.E., Coughlin L.A., Kim J., Froehlich T.W., Xie Y., Frenkel E.P., Koh A.Y. Metagenomic shotgun sequencing and unbiased metabolomic profiling identify specific human gut microbiota and metabolites associated with immune checkpoint therapy efficacy in melanoma patients. *Neoplasia*. 2017; 19 (10): 848-55. DOI: 10.1016/j.neo.2017.08.004.

MICROBIOLOGY

2. Matson V., Fessler J., Bao R., Chongsuwat T., Zha Y., Alegre M.L., Luke J.J., Gajewski T.F. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018; 359 (6371): 104-8. DOI: 10.1126/science.aao3290.
3. Dey P., Ray Chaudhuri S. Cancer-Associated Microbiota: From Mechanisms of disease causation to microbiota-centric anti-cancer approaches. *Biology (Basel)*. 2022; 11 (5): 757. DOI: 10.3390/biology11050757.
4. Poore G.D., Kopylova E., Zhu Q., Carpenter C., Fraraccio S., Wandro S. et al. Microbiome analyses of blood and tissues suggest cancer diagnostic approach. *Nature*. 2020; 579 (7800): 567-74. DOI: 10.1038/s41586-020-2095-1.
5. Deryagina V.P., Ryzhova N.I., Krivosheeva L.V., Golubeva I.S., Savluchinskaya L.A., Khochenkov D.A. iNOS expression and biosynthesis of nitric oxide metabolites in the course of tumor growth of different histogenesis. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2016; 3 (3): 73-80. DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-3-73-80. (in Russian)
6. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoilova D., Petrenko A., Zborovskaya I. et al. Lung microbiome differentially impacts survival of patients with non-small cell lung cancer depending on tumor stroma phenotype. *Biomedicines*. 2020; 8 (9): 349. DOI: 10.3390/biomedicines8090349.
7. Gao Y., Zhou S., Xu Y., Sheng S., Qian S.Y., Huo X. Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide*. 2019; 83: 33-9. DOI: 10.1016/j.niox.2018.12.008.
8. Fahey J.M., Girotti A.W. Nitric oxide-mediated resistance to photodynamic therapy in a human breast tumor xenograft model: Improved outcome with NOS2 inhibitors. *Nitric Oxide*. 2017; 62: 52-61. DOI: 10.1016/j.niox.2016.12.003.
9. Ekmekcioglu S., Grimm E.A., Roszik J. Targeting iNOS to increase efficacy of immunotherapies. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2017; 13 (5): 1105-8. DOI: 10.1080/21645515.2016.1276682.
10. Lopez-Rivera E., Jayaraman P., Parikh F., Davies M.A., Ekmekcioglu S., Izadmehr S. et al. Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2. *Cancer Res*. 2014; 74 (4): 1067-78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0588.
11. Garrido P., Shalaby A., Walsh E.M., Keane N., Webber M., Keane M.M. et al. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget*. 2017; 8 (46): 80568-88. DOI: 10.18632/oncotarget.19631.
12. Chen C.N., Hsieh F.J., Cheng Y.M., Chang K.J., Lee P.H. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in angiogenesis and clinical outcome of human gastric cancer. *Journal of surgical oncology*. 2006; 94 (3): 226-33. DOI: 10.1002/jso.20372.
13. Raspollini M.R., Amunni G., Villanucci A., Boddi V., Baroni G., Taddei A., Taddei G.L. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in ovarian cancer: correlation with clinical outcome. *Gynecol. Oncol*. 2004; 92 (3): 806-12. DOI: 10.1016/j.ygyno.2003.12.023.
14. Ropponen K.M., Kellokoski J.K., Lipponen P.K., Eskelinen M.J., Alanne L., Alhava E.M., Kosma V.M. Expression of inducible nitric oxide synthase in colorectal cancer and its association with prognosis. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2000; 35 (11): 1204-11. DOI: 10.1080/003655200750056709.
15. Li C., Li H., Jiang Z., Zhang T., Wang Y., Li Z., Wu Y., Ji S., Xiao S., Ryffel B., Radek K.A., Xia Z., Lai Y. Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin. *PLoS Pathog*. 2014; 10(2):e1003918. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003918.
16. Tate D.J.Jr., Patterson J.R., Velasco-Gonzalez C., Carroll E.N., Trinh J., Edwards D., Aiyar A. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int. J. Biol. Sci*. 2012; 8(8):1109-20. DOI: 10.7150/ijbs.4694.
17. Muglia V.F., Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol. Bras*. 2015; 48 (3): 166-74. DOI: 10.1590/0100-3984.2013.1927.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Чеснокова М. Г.^{1,2}, Чесноков С. А.³, Миронов А. Ю.^{4,5}

МИКОБИОТА ЗУБНОЙ БЛЯШКИ У ДЕТЕЙ С ЗУБОЧЕЛЮСТНЫМИ АНОМАЛИЯМИ ПРИ ОРТОДОНТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования РФ, 644050, Омск, Россия;

³ООО «ЦС Атлант» 644090, Омск, Россия;

⁴ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 115682, Москва, Россия

В процессе ортодонтического лечения врачу-ортодонту необходимо прогнозировать риск развития осложнений, предупредить их возникновение и разработать необходимые профилактические мероприятия. Возникает необходимость проведения этиотропной профилактики с целью коррекции возникающего микробного дисбаланса, при котором происходит выраженная колонизация биотопа полости рта микро- и микобиотой. Возникает необходимость эффективного применения антисептических препаратов у детей, обладающих низкой токсичностью, достаточной степенью адсорбции, широким спектром антибактериального действия, незначительной способностью формирования резистентных штаммов микроорганизмов. Цель исследования: изучение видового и количественного состава микобиоты зубной бляшки у детей с зубочелюстными аномалиями в процессе ортодонтического лечения и определение чувствительности грибов рода Candida к антисептикам. Определена видовая и количественная характеристика грибов рода Candida, входящих в состав биотопа зубной бляшки полости рта детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении. При выделены и идентифицированы грамположительные микроорганизмы родов Streptococcus, Enterococcus, Staphylococcus, Micrococcus, Corynebacterium, Lactobacillus, определена количественная характеристика ассоциантов микобиоты. Уровень чувствительности культур Candida albicans, выделенных из биоматериала зубной бляшки к антисептикам показал наибольшую чувствительность к метамидину 0,1% и наименьшую чувствительность к хлоргексидину биглюконат 0,05%, что свидетельствует о необходимости дифференцированного подхода при использовании антисептиков в процессе длительного ортодонтического лечения детей с зубочелюстными аномалиями.

Ключевые слова: микобиота; грибы; зубная бляшка; чувствительность к антисептическим препаратам; зубочелюстные аномалии; дети; ортодонтическое лечение.

Для цитирования: Чеснокова М. Г., Чесноков С. А., Миронов А. Ю. Микобиота зубной бляшки у детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 237-242. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-237-242>

Для корреспонденции: Чеснокова Марина Геннадьевна, д-р мед. наук, проф., проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.03.2023

Принята к печати 23.03.2023

Опубликовано 00.04.2023

Chesnokova M. G.^{1,2}, Chesnokov S. A.³, Mironov A. Yu.^{4,5}

MYCOBIOTA OF DENTAL PLAQUE IN CHILDREN WITH DENTAL ANOMALIES DURING ORTHODONTIC TREATMENT

¹FGBOU VO «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 644099, Omsk, Russia;

²FGBOU VO «Omsk State Technical University» of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 644050, Omsk, Russia;

³LLC «CS Atlant» 644090, Omsk, Russia;

⁴FBUN G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

⁵Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies FMBA, 115682, Moscow, Russia

In the process of orthodontic treatment, the orthodontist needs to predict the risk of complications, prevent its occurrence and develop the necessary preventive measures. there is a need for etiotropic prophylaxis in order to correct the emerging microbial imbalance, in which there is a pronounced colonization of the biotope of the oral cavity with micro- and mycobiota. In this regard, there is a need for the effective use of antiseptic drugs in children with low toxicity, a sufficient degree of adsorption, a wide spectrum of antibacterial action, and a slight ability to form resistant strains of microorganisms. The aim of the study was to study the qualitative and quantitative composition of the mycobiota present in the microbiocenosis of dental plaque in children with dentoalveolar anomalies during orthodontic treatment and to determine the nature of the sensitivity of yeast-like fungi of the genus Candida to antiseptics.

The qualitative and quantitative characteristics of Candida albicans fungi, which are part of the biotope of dental plaque in children with dentoalveolar anomalies during orthodontic treatment, were determined. During bacteriological detection, the predominant iso-

lation of gram-positive microorganisms of the genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* was identified, and the quantitative characteristics of microbiota associates were determined. The level of sensitivity of *Candida albicans* cultures isolated from dental plaque biomaterial to antiseptics showed the highest sensitivity to mestamidine 0.1% and the lowest sensitivity to chlorhexidine bigluconate 0.05%. The results indicate the need for a differentiated approach when using antiseptics in the process of long-term orthodontic treatment of children with dentoalveolar anomalies.

Key words: mycobiota; yeast-like fungi; dental plaque; sensitivity to antiseptic drugs; dental anomalies; children; orthodontic treatment.

For citation: Chesnokova M. G., Chesnokov S. A., Mironov A. Yu. Mycobiota of dental plaque in children with dental anomalies during orthodontic treatment. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 237-242 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-237-242>

For correspondence: Chesnokova Marina Gennad'evna, DR med. sciences, prof., prof. cafe microbiology, virology and immunology; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Information about authors:

Chesnokova M.G., <https://orcid.org/0000-0001-9055-977X>;

Chesnokov S.A., <https://orcid.org/0009-0006-0800-0947>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.03.2023

Accepted 23.03.2023

Published 00.04.2023

Ведущая роль микрофлоры зубной бляшки в развитии многих стоматологических заболеваний установлена рядом исследований [1, 2]. Получены результаты углублённого исследования микробных биоплёнок полости рта при ортопедической реабилитации стоматологических пациентов и в пародонтологической практике [3, 4]. При использовании несъёмной ортодонтической техники с применением брекет-системы у детей, находящихся на лечении аномалий зубочелюстной системы возникает риск развития кариеса и его осложнений [5, 6]. Помимо естественных ретенционных пунктов для колонизации микроорганизмов во время ортодонтического лечения несъёмной аппаратурой происходит изменение видового и количественного состава микробиоты полости рта, увеличивается количество условно-патогенных микроорганизмов, более часто выявление нетипичных для данного биотопа видов микроорганизмов [7].

Применение лазерной интерференционной микроскопии позволило получить изображения биоплёнки грибов *C. albicans* и оценить её морфологические особенности [8, 9].

Возникает необходимость проведения этиотропной профилактики с целью коррекции возникающего микробного дисбаланса, при котором происходит выраженной колонизация биотопа полости рта микро- и микобиотой [10, 11]. При ортодонтическом лечении детей несъёмной аппаратурой в составе микробиоценоза зубной бляшки полости рта в качестве ассоциантов встречаются грибы *C. albicans* для которых полость рта представляет благоприятную экологическую нишу для колонизации [12, 13]. Бактерии рода *Lactobacillus* вступают в конкуренцию с грибами рода *Candida* за пищевые субстраты и рецепторы адгезии, выделяют при этом фунгицидные факторы, межвидовые взаимодействия грибов рода *Candida* с микроорганизмами активизируют адгезию к эпителию и микотическую колонизацию полости рта [14]. При инвазии в ткани парадонта *C. albicans* трансформируются в тканевую форму с уменьшением толщины клеточной стенки. Для грибов

C. albicans характерна высокая изменчивость, формирующаяся в результате воздействия факторов внешней среды, детерминированная антигенами, происходят изменения структуры клеточной стенки, обуславливающие лабильность антигенной структуры [15, 16].

Решение данной проблемы является важнейшей задачей и определяется индивидуальными особенностями чувствительности организма ребёнка к воздействию факторов, участвующих в развитии кариеса и своевременного применения необходимых и действенных мер профилактики [17]. В процессе ортодонтического лечения врачу-ортодонт необходимо прогнозировать риск развития осложнений, предупредить их возникновение и разработать необходимые профилактические мероприятия.

Возникает необходимость обязательного внедрения и совершенствования первичной этиотропной профилактики кариеса, направленной на коррекцию микробиоценоза полости рта, устранение продуктов жизнедеятельности микробиоты биотопа зубной бляшки, проведение профессиональной гигиены полости рта. К методам коррекции микробного состава зубной бляшки следует отнести ограничение условий, способствующих нарушению микробного гомеостаза, применение антимикробных препаратов (АМП) [13, 18]. АМП, применяемые с целью коррекции микробного состава зубной бляшки у детей должны обладать низкой токсичностью, достаточной степенью адсорбции, широким спектром антибактериального действия, незначительной способностью формирования резистентных штаммов микроорганизмов.

Цель исследования: изучение видового и количественного состава микобиоты зубной бляшки у детей с зубочелюстными аномалиями в процессе ортодонтического лечения и определение чувствительности грибов рода *Candida* к антисептикам.

Материал и методы. Исследования проводили на разных сроках лечения детей с зубочелюстными аномалиями с применением несъёмной ортодонтической техники. Обследованы 57 пациентов в возрасте

от 9 до 15 лет, взятие биоматериала зубной бляшки осуществляли после проведения пациентами тщательной гигиенической обработки полости рта. Бляшку, расположенную на гладкой поверхности снимали при соскабливании стерильным инструментом (экскаватором, скейлером), при снятии бляшки с апроксимальной поверхности зуба использована стерильная нить. После диспергирования материала проводили микробиологическое и культуральное исследование, применяли жидкую транспортную тиогликолевую питательную среду. Биоматериал после взятия доставляли в бактериологическую лабораторию не позднее, чем через 2 часа. При культуральном исследовании биоматериал зубной бляшки засеивали на соответствующие питательные среды с дальнейшим инкубированием, видовой идентификацией и регистрацией результатов исследования.

При культуральном исследовании устанавливали видовую и количественную характеристику микроорганизмов в биоматериале. Количественную характеристику бактерий и грибов определяли по числу выросших изолированных колоний, выраженную через десятичный логарифм (lg КОЕ/мл).

При микологическом исследовании биоматериал пациентов сеяли на питательную среду Сабуро, изучали колонии, отвечающие макро- и микроморфологическим признакам грибов рода *Candida*. При идентификации *C. albicans* проводили тест на образование герминативных проростковых трубок, тест ассимиляции углеводов, тест ферментации углеводов, выявление хламидоспор. Для селективной изоляции грибов использовали среду Candi select 4 (Biogad, Франция) с целью прямой идентификации видов грибов *Candida*.

Изучение чувствительности *Candida albicans* к антисептическим препаратам проводили методом серийных разведений на плотной питательной среде с разными концентрациями антисептиков хлоргексидина биглюконат 0,05%, мирамистина 0,01%, местамидина 0,1%. Регистрировали чувствительность культур к данной концентрации антисептика на питательной среде. Для сравнительного анализа определяли индивидуальные значения минимальной подавляющей концентрации (МПК), средние показатели для выборок, амплитуду индивидуальных МПК культур в выборках, устанавливали частоту присутствия резистентных культур.

От родителей пациентов получено добровольное информированное согласие на микробиологическое исследование.

Биометрический анализ осуществляли с использованием пакетов STATISTICA-6, БИОСТАТИСТИКА. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости p принимался равным 0,05. При этом значении p могли ранжироваться по 3 уровням достигнутых статистически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Результаты. Изучение микробиоценоза зубной бляшки у детей показало преимущественное выделение грамположительных бактерий, принадлежащих к родам *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*. При

культуральном исследовании идентифицированы бактерии рода *Streptococcus* – виды *S. mutans* в 61,4% случаев, *S. salivarius* в 54,4%, *S. sanguis* в 63,16% случаев, *S. mitis* в 36,8% случаев, *S. viridans* в 45,6% случаев. Бактерии рода *Staphylococcus* представлены видами *S. aureus* в 8,8%, *S. epidermidis* в 31,6%, *S. saprophyticus* в 19,3% случаев. *Enterococcus faecalis* встречались в 29,82% случаев. Представители родов *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp. идентифицированы соответственно, в 21,05%, 47,4%, 50,9% исследований. Грамотрицательные палочки рода *Klebsiella* высевали в 7,02%, грамотрицательные кокки рода *Neisseria* – в 23% случаев.

Количественная характеристика выделения грамположительных кокков микробиоты зубной бляшки полости рта детей при ортодонтическом лечении представлена на рис. 1. Микроорганизмы рода *Streptococcus* выявляли в различных количествах: *S. mutans* в средней концентрации $5,2 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 6,00), *S. salivarius* – в $4,74 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 6,00), *S. sanguis* в концентрации $5,03 \pm 0,11$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 6,00). *S. mitis* выявляли в средней концентрации $5,53 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл (медиана – 6,00, процентиль 10,00 – 5,00, процентиль 90,00 – 6,00), *S. viridans* – в $4,73 \pm 0,12$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00). Бактерии рода *Staphylococcus* выявляли: *S. aureus* в $4,4 \pm 0,24$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00), *S. epidermidis* в $4,72 \pm 0,14$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00), *S. saprophyticus* в $4,54 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00). Бактерии рода *Enterococcus* выявляли: *E. faecalis* при содержании в биоматериале $5,06 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл (медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 6,00).

Грамположительные бактерии рода *Micrococcus* высевали в средней концентрации $4,33 \pm 0,14$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00), коринебактерии – $3,88 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 3,00, процентиль 90,00 – 5,00). Лактобактерии встречались в концентрации $3,83 \pm 0,15$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 3,00, процентиль 90,00 – 5,00). Бактерии рода *Neisseria* идентифицировали в средней концентрации $4,31 \pm 0,13$ lg КОЕ/мл (медиана – 4,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00), бактерии рода *Klebsiella* – в $3,5 \pm 0,29$ lg КОЕ/мл (медиана – 3,5, процентиль 10,00 – 3,00, процентиль 90,00 – 4,00).

Микологическое исследование биоматериала зубной бляшки позволило идентифицировать грибы рода *Candida*, вида *Candida albicans* в 21,05% случаев образцов биоматериала. При определении количества выявленных грибов установлена средняя концентрация $4,67 \pm 0,14$ lg КОЕ/мл, медиана – 5,00, процентиль 10,00 – 4,00, процентиль 90,00 – 5,00 (рис. 2).

При микологическом исследовании зубной бляшки детей выделена 71 культура грибов рода *Candida*, идентифицированная до вида *Candida albicans*.

MICROBIOLOGY

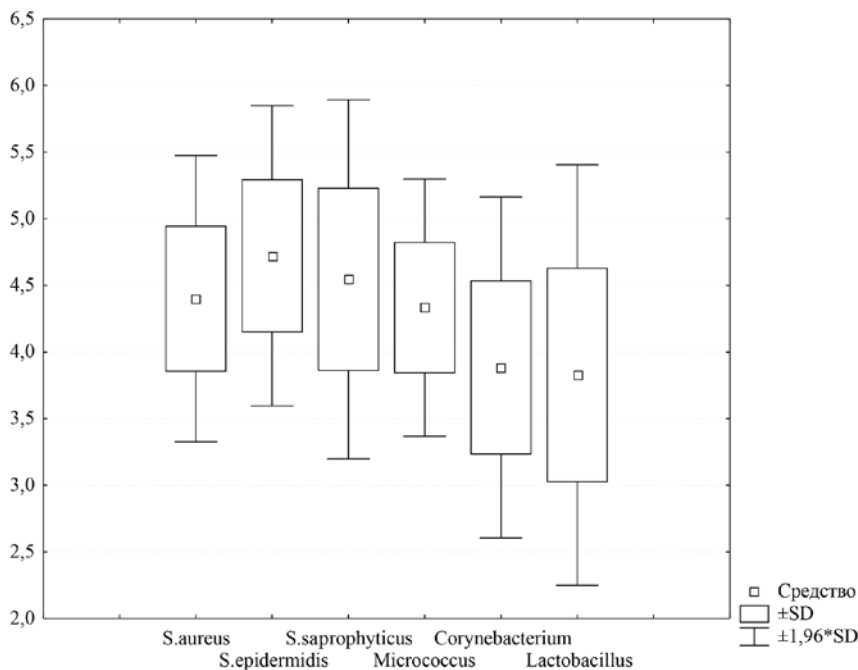


Рис. 1. Обсеменённость грамположительной микробиотой биоматериала зубной бляшки детей. По оси абсцисс – виды микроорганизмов; по оси ординат – значение концентрации (lg КОЕ/мл).

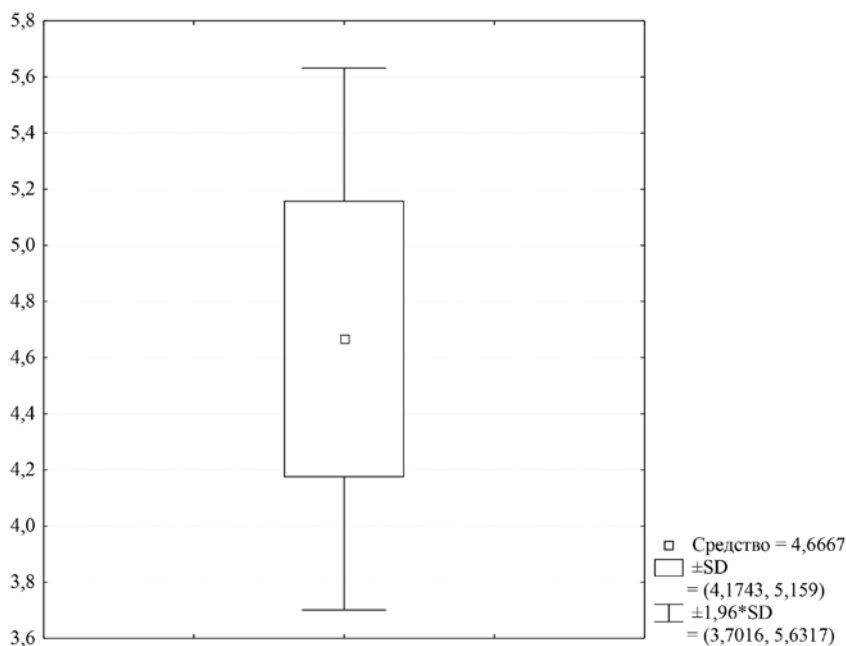


Рис. 2. Обсеменённость грибами биоматериала зубной бляшки детей при ортодонтическом лечении.

Клинические изоляты грибов оценивали по уровню чувствительности к антисептическим препаратам – хлоргексидину 0,05%, мирамистину 0,01%, местамидину 0,1%. Определена наибольшая чувствительность клинических штаммов *C. albicans* к антисептическим препаратам местамидину 0,1% – 97,18% и мирамистину 0,01% – 88,73%. К хлоргексидину биглюконат 0,05% отмечалась наименьшая чувствительность – 70,42% случаев.

МПК антисептиков (хлоргексидина 0,05%, мирамистина 0,01%, местамидина 0,1%) для клинических штаммов *C. albicans* представлены на рис. 3. Определена средняя величина МПК к хлоргексидину 0,05%

– $0,075 \pm 0,007$, медиана – 0,07, процентиль – 10,00 – 0,00, процентиль – 90,00 – 0,14. К мирамистину 0,01% установлена средняя величина МПК $0,022 \pm 0,002$, медиана 0,02, процентиль 10,00 – 0,00, процентиль 90,00 – 0,05. К местамидину 0,1% чувствительность соответствовала средней величине МПК – $0,164 \pm 0,007$, медиане 0,07, процентилю 10,00 – 0,10, процентилю 90,00 – 0,30.

Заключение. Результаты микологического исследования биоматериала зубной бляшки детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении показали наличие грибов *C. albicans* среди ассоциантов микробиоценоза, принадлежащих к ро-

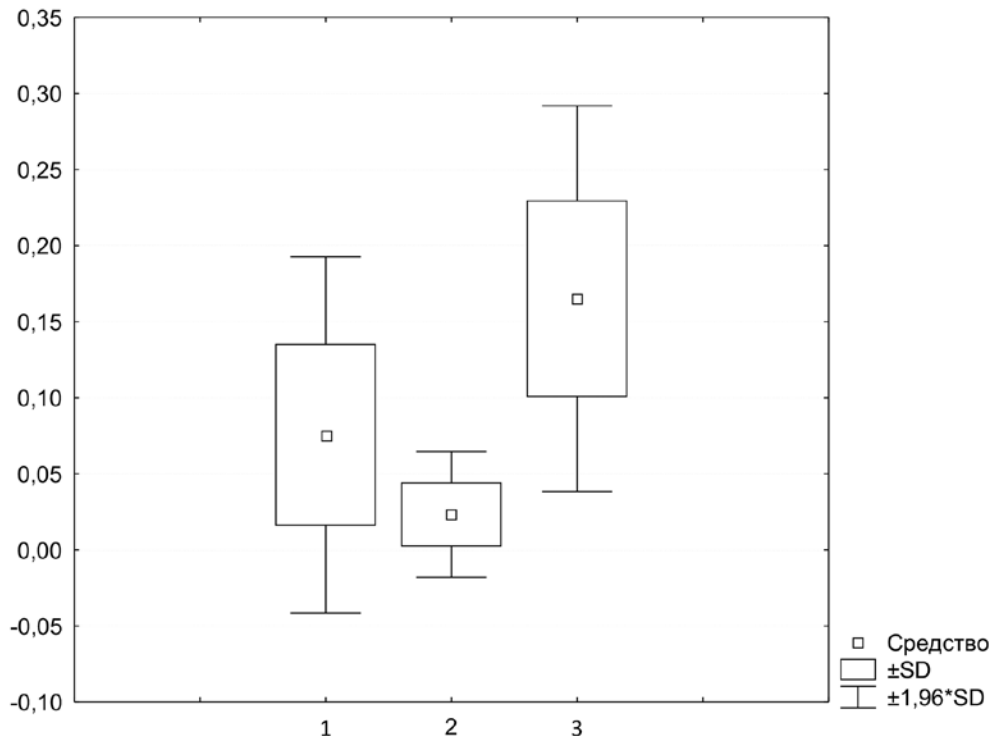


Рис. 3. Уровень показателя МПК антисептиков тестируемых культур *Candida albicans*

По оси абсцисс – антисептические препараты: 1 – хлоргексидина биглюконат 0,05%, 2 – мирамистин 0,01%, 3 – метамидин 0,1%; по оси ординат – значение МПК.

дам *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, колонизирующих зубную бляшку в различной концентрации. Определена количественная характеристика грибов *Candida albicans*, входящих в состав биотопа зубной бляшки детей с зубочелюстными аномалиями при ортодонтическом лечении при высеваемости в 21,05% случаев и средней концентрации $4,67 \pm 0,14$ lg КОЕ. Оценка уровня чувствительности культур *C. albicans*, выделенных из биоматериала зубной бляшки полости рта детей к антисептическим препаратам, показала наибольшую чувствительность к метамидину 0,1%. Антисептик хлоргексидина биглюконат 0,05% по отношению к тестируемым клиническим штаммам *Candida albicans* проявлял наименьшую чувствительность. Определены уровни средней величины МПК к антисептическим препаратам у клинических штаммов *Candida albicans*.

Полученные данные свидетельствуют о важности проведения микологического мониторинга биоматериала зубной бляшки полости рта детей при длительном ортодонтическом лечении зубочелюстных аномалий. Результаты исследования демонстрируют наличие гетерогенности клинических штаммов *C. albicans* по чувствительности к используемым антисептическим препаратам. Определение чувствительности культур *C. albicans*, выделенных из биоматериала пациентов к антисептикам показало их существенные различия, с наиболее выраженной устойчивостью к хлоргексидину биглюконат 0,05%, средне выраженной устойчивостью к мирамистину 0,01%. Следует отметить преоб-

ладающую чувствительность клинических штаммов *C. albicans* к метамидину 0,1%. Возникает необходимость проведения более дифференцированного подхода с использованием антисептических препаратов в стоматологии, особенно при ортодонтическом лечении детей с зубочелюстными аномалиями, как с профилактической, так и с терапевтической целью.

C. albicans, колонизирующие зубную бляшку детей при ортодонтическом лечении, в процессе адаптации к специфическим условиям существования во время длительного лечения подвергаются селекции с развитием устойчивых форм и повышения МПК антисептиков.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 10-12 см. REFERENCES)

1. Чуракина В.В., Хайдукова А.О. Влияние брекет-системы на состояние микрофлоры полости рта. *Бюллетень Северного государственного медицинского университета*. 2020; 44 (1): 71-2.
2. Чепуркова О. А., Чеснокова М. Г., Недосеко В. Б., Миронов А. Ю. Кандида-ассоциированный пародонтит. Диагностика, лечение. Омск: Вариант-Омск; 2012.
3. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Анализ уровня ортопедической реабилитации при изучении микробиома и оценке степени фиксации съёмных пластиночных протезов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (10): 588-93.
4. Харсеева Г. Г., Фролова Я. Н., Миронов А. Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.
5. Крихели Н.И., Сувкова Е.И., Аракелян И.Р., Пашковская А.Э., Михалева И.Н. Диагностика кариеса зубов при ортодонтическом лечении несъемной аппаратурой. *Российская стоматология*. 2016; 9(1):95-6.

MICROBIOLOGY

6. Горлачева Т.В. Терехова Т.Н. Деминерализация эмали зубов у пациентов, находящихся на ортодонтическом лечении с использованием несъемной техники. *Ортодонтия. Гнатология*. 2020; 3:45-50.
7. Скубицкая А.Г., Фирсова И.В., Поройский С.В., Струсовская О.Г. Эффективность применения стоматологического геля на основе экстракта барбариса при лечении катарального гингивита у пациентов, находящихся на ортодонтическом лечении с использованием несъемной техники. *Стоматология детского возраста и профилактика*. 2021; 77(1): 51-6.
8. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю., Блесман А.И., Полонянкин Д.А. Анализ микрорельефа биоплёнки грибов *Candida albicans* базисных пластмасс методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7):407-13.
9. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (5):308-13.
13. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г., Сунцов В.Г. Особенности динамики микробиоценоза зубной бляшки детей при коррекции препаратом 0,1% хлоргексидина биглюконат в процессе ортодонтического лечения зубочелюстных аномалий. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2011; 37 (4):118-20.
14. Червинец Ю. В., Червинец В.М., Миронов А.Ю. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта. Тверь: Тверской государственный медицинский университет; 2016. ISBN 978-5-8388-0161-6.
15. Леонов В.В., Миронов А.Ю. Железозависимость биологические свойства *Candida albicans*. *Альманах клинической медицины*. 2017; 45(2): 133-7.
16. Игнатова Н.И., Заславская М.И., Александрова Н.А., Орлова О.Е., Мельников В.Г. Влияние метаболитов *Candida* spp. на фибробласты кожи человека. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12 (2):381-5.
17. Абрамова М.Я., Лукина Г.И., Мамацшвили В.Г. Анализ состояния твердых тканей зубов после ортодонтического лечения с использованием несъемной назубной ортодонтической техники. *Российская стоматология*. 2022; 15(3):65-6.
18. Бриль Е.А., Бакшеева С.Л., Чижов Ю.В., Тишкова Е.С., Макаrchuk Т.М., Шишков Н.Ю. Первичная профилактика основных стоматологических заболеваний на этапах ортодонтического лечения. *Институт стоматологии*. 2019; 82(1):80-1.
- of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)
5. Krikheli N.I., Suvkova E.I., Arakelyan I.R., Pashkovskaya A.E., Mikhaleva I.N. Diagnosis of dental caries in orthodontic treatment with fixed equipment. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2016; 9(1):95-6. (in Russian)
6. Gorlacheva T.V. Terekhova T.N. Demineralization of tooth enamel in patients undergoing orthodontic treatment using fixed appliances. *Ortodontiya. Gnatologiya*. 2020; 3:45-50. (in Russian)
7. Skubitskaya A.G., Firsova I.V., Poroisky S.V., Strusovskaya O.G. The effectiveness of the use of dental gel based on barberry extract in the treatment of catarrhal gingivitis in patients undergoing orthodontic treatment using fixed appliances. *Stomatologiya detskogo vozrasta i profilaktika*. 2021; 77(1):51-6. (in Russian)
8. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu., Blesman A.I., Polonyankin D.A. Analysis of the microrelief of the *Candida albicans* fungus biofilm of basic plastics by laser modulation interference microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67 (7):407-13. (in Russian)
9. Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu. Application of scanning electron microscopy to study the biofilms of *Candida albicans* on the surface of base plastics of removable orthopedic structures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(5): 308-13. (in Russian)
10. Xu J., Mitchell T.G. Geographical differences in human oral yeast flora. *Clin. Infect. Dis*. 2003; 36(2): 221-4.
11. Berlutti F., Catizone A., Ricci G. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus are able to adhere and invade human gingival fibroblast cell line. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2010; 23 (4): 1253-60.
12. Kishi M., Abe A., Kishi K. Relations of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mother's caries status and colonization of mutans Streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. *Community Dent. Oral Epidemiol*. 2009; 37 (3): 241-9.
13. Chesnokov V.A., Chesnokova M.G., Suntsov V.G. Peculiarities of the dynamics of microbiocenosis of dental plaque in children during correction with 0.1% chlorhexidine bigluconate during orthodontic treatment of dentoalveolar anomalies. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 37 (4):118-20. (in Russian)
14. Chervinets Yu.V., Chervinets V.M., Mironov A.Yu. Symbiotic relationships of lactobacilli and microorganisms of the gastrointestinal tract. Tver': Tverskoy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2016. ISBN 978-5-8388-0161-6. (in Russian)
15. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Iron dependence of the biological properties of *Candida albicans*. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2017; 45(2):133-7. (in Russian)
16. Ignatova N.I., Zaslavskaya M.I., Aleksandrova N.A., Orlova O.E., Mel'nikov V.G. Influence of metabolites of *Candida* spp. on human skin fibroblasts. *Infektsiya i immunitet*. 2022; 12 (2):381-5. (in Russian)
17. Abramova M.Ya., Lukina G.I., Mamatsashvili V.G. Analysis of the state of hard tissues of teeth after orthodontic treatment using non-removable dental orthodontic equipment. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2022; 15 (3): 65-6. (in Russian)
18. Bril E.A., Baksheeva S.L., Chizhov Yu.V., Tishkova E.S., Makarchuk T.M., Shishkov N.Yu. Primary prevention of major dental diseases at the stages of orthodontic treatment. *Институт стоматологии*. 2019; 82(1):80-1. (in Russian)

REFERENCES

1. Churakina V.V., Khaydukova A.O. Influence of the bracket system on the state of the microflora of the oral cavity. *Byulleten' Severnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2020; 44 (1): 71-2. (in Russian)
2. Chepurkova O. A., Chesnokova M. G., Nedoseko V. B., Mironov A. Yu. Candida associated parodontitis. Diagnostics. Treatment. Omsk: Variant-Omsk; 2012. (in Russian)
3. Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu. Analysis of the level of orthopedic rehabilitation in the study of the microbiome and assessment of the degree of fixation of removable lamellar dentures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(10): 588-93. (in Russian)
4. Kharseeva G.G., Frolova Ya.N., Mironov A.Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronicity

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© МАРДАНЛЫ С.Г., ЖИГАЛЕВА О.Н., 2023

Марданлы С.Г.^{1,2}, Жигалева О.Н.¹

АНАЛИЗ ТРЕБОВАНИЙ К ПРОМЫШЛЕННОМУ ПРОИЗВОДСТВУ ПЦР-ДИАГНОСТИКУМОВ

¹ЗАО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²ГОУ ВО МО Государственный гуманитарно-технологический университет, 142600, г. Орехово-Зуево Московская обл., Россия

В статье дан анализ требований надлежащей производственной практики Rules of good manufacturing practice (GMP), т. е. правил GMP и гигиены труда к промышленному производству ПЦР-диагностикумов и сформулированы условия, гарантирующие выполнение необходимых гигиенических требований и качество выпускаемой продукции.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция (ПЦР); ПЦР-диагностикумы; промышленное производство ПЦР-диагностикумов; требования GMP, гигиена труда.

Для цитирования: Марданлы С.Г., Жигалева О.Н. Анализ требований к промышленному производству ПЦР-диагностикумов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (4): 243-248. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-243-248>.

Для корреспонденции: Марданлы Сейфадин Гашимович, д-р мед. наук, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 15.03.2023

Принята к печати 21.03.2023

Опубликовано 00.04.2023

Mardanly S.G.^{1,2}, Zhigaleva O.N.¹

ANALYSIS OF REQUIREMENTS FOR INDUSTRIAL PRODUCTION OF PCR DIAGNOSTICS

¹ZAO «ECOLab», 142530, Elektrogorsk, Moscow region, Russia;

²GOU IN OMSTU, 142600, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia

The article analyzes the requirements of good manufacturing practice (Rules of good manufacturing practice), i.e. GMP and occupational hygiene rules for the industrial production of PCR diagnostics, and formulated conditions that guarantee the fulfillment of the necessary hygienic requirements and the quality of products.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), PCR diagnostics; industrial production of PCR diagnostics; GMP requirements; occupational hygiene.

For citation: Mardanly S.G., Zhigaleva O.N. Analysis of requirements for industrial production of PCR diagnostics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (4): 243-248. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-4-243-248>.

For correspondence: Mardanly S.G., Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Disciplines of the State University of Humanities and Technology; e-mail: ekolab-president@mail.ru

Information about authors:

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Zhigaleva O.N., <https://orcid.org/0000-0002-5003-1089>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.03.2023

Accepted 21.03.2023

Published 00.04.2023

Диагностические исследования с использованием основанных на технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) методик выявления нуклеиновых кислот в анализируемых образцах, в последние годы стали одним из наиболее перспективных направлений развития клинической лабораторной диагностики [1, 2]. Поэтому неудивительно, что номенклатура производства ПЦР-тестов стремительно растет, как в мире,

так и в Российской Федерации. Последнее особенно важно в связи с резким сокращением возможностей импорта соответствующей продукции.

На этом фоне приобретает несомненную актуальность анализ требований, предъявляемых к производствам ПЦР-диагностикумов как по линии обеспечения качества выпускаемой продукции, так и по линии гигиены труда на этих производствах. Такой анализ

актуален, прежде всего, потому что нормативные документы, регламентирующие указанные требования применительно именно к производствам ПЦР-диагностикумов, к настоящему времени в Российской Федерации еще не разработаны.

Очевидно, что к этим производствам применимы требования Правил надлежащей производственной практики Rules of good manufacturing practice, т. е. правил GMP [3, 4], гигиенические требования к промышленным производствам вообще, а также конкретно к биотехнологическим и химико-фармацевтическим производствам [5-8]. Ответы на ряд частных вопросов организации производств ПЦР-диагностикумов можно найти в документах, регламентирующих правила организации и проведения ПЦР-исследований в лабораториях [9-11].

Исходя из этих требований, промышленная площадка производства ПЦР-диагностикумов должна быть достаточного размера, размещаться на сухом, хорошо проветриваемом и инсолируемом участке с низким стоянием грунтовых вод на расстоянии 50–1000 м от жилой зоны. Плотность застройки территории должна составлять 20–65 %, площадь озеленения – не меньше 15 % [8].

В соответствии с Правилами GMP [3, 4]:

- производственные помещения должны проектироваться и эксплуатироваться с обязательным учетом проводимых в них операций; расположение и конструктивные особенности помещений должны обеспечивать возможность эффективной обработки для исключения накопления в них пыли или грязи, а при работе с микробными культурами исключать возможность перекрестной контаминации;

- производство должно быть обеспечено необходимым набором и достаточными площадями производственных, вспомогательных и санитарно-бытовых помещений;

- объем производственных помещений на одного работника должен составлять не менее 15 м³, площадь – не менее 4,5 м² при высоте 3,2 м;

- в производственных помещениях должны быть выделены зоны рабочих мест с оборудованием, складские помещения, санитарно-бытовые помещения;

- складские зоны должны быть достаточно вместительными, чтобы обеспечить упорядоченное хранение исходного сырья, упаковочных материалов, промежуточной, нерасфасованной и готовой продукции, а также готовой продукции, находящейся в карантине, разрешенной для реализации, отбракованной, возвращенной или отозванной и других категорий материалов и продукции; они должны обеспечивать надлежащие условия хранения;

- в местах приемки сырья и материалов, а также отгрузки готовой продукции должна быть обеспечена защита материалов и продукции от воздействия метеорологических факторов; зоны приемки должны позволять при необходимости очистку контейнеров с поступающими материалами перед их складированием; для хранения отбракованных, отозванных или возвращенных материалов, исходного сырья должны быть предусмотрены изолированные зоны;

- помещения лаборатории по контролю качества должны быть отделены от производственных зон.

Проблемы гигиены труда на производстве ПЦР-диагностикумов прямо вытекают из технологических особенностей указанного производства, которое базируется на использовании сырья, получаемого с помощью молекулярной биотехнологии – новой области исследований, возникшей на стыке традиционной биотехнологии и технологии рекомбинантных дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) [2].

Технология рекомбинантных ДНК (или молекулярное клонирование, или геновая инженерия) — это совокупность приемов, позволяющих осуществлять перенос ДНК из одного организма в другой. Обычно она выполняется по следующей схеме [2]:

- из организма-донора нужных генов экстрагируют нативную ДНК (клонированная ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК), подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонированный вектор - встроенная ДНК»);

- эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиента), где она реплицируется и передается потомкам (этот процесс называется трансформацией);

- идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки);

- получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами, что служит подтверждением клонирования искомого гена.

Подобный перенос генетического материала есть, по сути, создание нового, не существующего в природе организма, что, естественно, на первых порах вызывало крайне отрицательное отношение к подобным манипуляциям и потребовало тщательной оценки реальных опасностей широкого внедрения этих технологий. Но в итоге, все же было признано, что меры безопасности, которые принимаются при работе с патогенными организмами, с добавлением специальных правил, исключающих случайный выброс в окружающую среду генетически модифицированных организмов при их крупномасштабном культивировании, вполне достаточны для обеспечения безопасности генно-инженерных исследований [2].

Следует отметить, что производство ПЦР-диагностикумов, хотя и связано с генно-инженерными исследованиями при наработке специфических компонентов этих наборов (положительные контрольные образцы, ПЦР-реагенты, праймеры), все же не требует крупномасштабного культивирования генетически измененных микроорганизмов, т.е. оно не связано с соответствующими рисками загрязнения окружающей среды указанными продуктами.

Кроме того, при проектировании соответствующего производства и разработке необходимых мер по охране труда на нем, необходимо учитывать планируется ли использование на этом производстве закупных специфических компонентов ПЦР-диагностикумов, или получение этих компонентов планируется на самом проектируемом производстве.

Очевидно, что в первом случае проблемы охраны труда становятся практически идентичными тем, что возникают на производстве обычных биохимических диагностикумов. А во втором могут добавиться проблемы обеспечения безопасности персонала, занятого работами с патогенными микроорганизмами, если таковые необходимы для получения специфических компонентов ПЦР-диагностикумов [5, 11, 12].

Требования гигиены труда при производстве ПЦР-диагностикумов прямо определяются технологиями этих производств, которые, в свою очередь, определяются назначением и, соответственно, составом реагентов, входящих в набор. Последняя характеристика позволяет разделить эти наборы на три группы: 1) наборы, предназначенные только для выделения анализа (диагностируемой нуклеиновой кислоты) из исследуемых образцов, 2) наборы, предназначенные только для оценки наличия анализа в продуктах, полученных из клинических образцов с использованием наборов первой группы, и 3) наборы, предназначенные как для выделения анализа из исследуемых клинических образцов, так и для оценки его наличия в полученных при этом материалах.

Поскольку само производство ПЦР-диагностикумов, с точки зрения охраны труда, не создает новых проблем сравнительно с производствами обычных диагностических наборов, на первый план выступают проблемы обеспечения качества продукции, поскольку, с этих позиций, самым уязвимым местом в таких производствах становится основное преимущество самого метода исследования – его высокая чувствительность и, соответственно, необходимость снижения до практически незначимых значений вероятности искажения результатов ПЦР за счет неспецифической контаминации специфических компонентов наборов [6].

Как уже отмечалось, требования к проведению ПЦР-исследований регламентированы сегодня только для лабораторий, в которых эти исследования проводятся [10, 11]. Соответственно, они в полной мере относятся к работе лабораторных подразделений, занимающихся контролем качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Однако, часть этих требований может быть распространена и на технологические операции, связанные с приготовлением специфических компонентов ПЦР-диагностикумов.

Так, аналогично требованиям к лабораторным помещениям [9] производственные помещения должны отвечать следующим требованиям:

- внутренняя отделка должна быть выполнена в соответствии с их функциональным назначением и гигиеническими нормативами. Поверхность пола, стен, потолка должна быть гладкой, без щелей, устойчивой к многократному действию моющих и дезинфицирующих средств;

- не допускается устройство подвесных потолков, не отвечающих указанным требованиям, и подпольных каналов;

- выступающие и проходящие трубы (батареи отопления) располагают на расстоянии от стен с целью возможности проведения их дезинфекции, места ввода инженерных коммуникаций должны быть герметичными;

- отопительные приборы должны иметь гладкую легко очищаемую поверхность;

- оборудование и мебель должны быть гладкими, без острых краев и шероховатостей и иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств. Поверхность столов не должна иметь швов и трещин;

- не допускается использование мебели из древесины и с мягким покрытием;

- в помещениях должна быть предусмотрена защита рабочих мест от попадания прямого солнечного света. Для этих целей могут быть использованы светозащитная пленка, жалюзи из материала, устойчивого к воздействию дезинфицирующих растворов;

- освещение рабочих мест, температура и влажность воздуха должны обеспечивать выполнение соответствующих гигиенических требований и не оказывать неблагоприятного воздействия ни на реагенты во время их производства и хранения, ни на точность функционирования оборудования.

Порядок уборки производственных помещений должен включать ежедневную текущую влажную уборку полов разрешенными к применению дезинфицирующими средствами и ежедневное обеззараживание ультрафиолетовым излучением до начала работы и после окончания влажной уборки. При этом ультрафиолетовые лампы должны соответствовать следующим параметрам:

- длина волны – 260 нм (типа ДБ-60);

- расчетная мощность – 2,5 Вт на 1 м³;

- продолжительность работы лампы: в течение 45–60 минут до начала и 45–60 минут после окончания работы операторов.

Перед началом работы поверхности столов (биологических боксов) и оборудования, контактирующего с сырьем для производства специфических реагентов, их полуфабрикатами и готовыми реагентами, следует обрабатывать 70%-м этиловым спиртом.

Еженедельно должна проводиться генеральная уборка с применением дезинфицирующих средств путем протирания поверхностей мебели, приборов, оборудования, а также стен на высоту до 2 м. Допускается использование аэрозольного метода дезинфекции.

Стеклопленочные поверхности бактерицидных ламп следует протирать в выключенном положении ветошью, смоченной спиртом, не реже 1 раза в неделю.

Каждая рабочая зона должна быть обеспечена промаркированным набором уборочного инвентаря, не допускается использование индивидуального уборочного инвентаря для уборки других помещений.

Если в лаборатории для поддержания нормируемых параметров микроклимата установлены кондиционеры, то, во-первых, на время работы они должны быть выключены, а, во-вторых, радиаторная решетка и накопитель конденсата должны подвергаться ежемесячной очистке и обработке хлорсодержащими средствами с заменой фильтров.

Не реже, чем один раз в год должна осуществляться обработка автоматических дозаторов. При этом автотитруемые дозаторы обеззараживают паром под

давлением 1,7 ати при температуре 120 °С в течение 20 минут. По окончании обработки дозаторы собирают и проводят их калибровку в соответствии с прилагаемой инструкцией по пользованию дозаторами.

Класс опасности отходов и правила обращения с ними на производствах ПЦР-диагностикумов будет определяться опасностью того патогена, чья нуклеиновая кислота является анализом, для выявления которого предназначен производимый диагностикум, а также токсичностью сырья, используемого для производства неспецифических реагентов набора, т.е. в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 [14] они могут относиться либо только к классу А, либо к классам А и Б, либо к классам А и Г, тогда как отходы ПЦР-лабораторий, как правило, относятся к классу Б [9]. При чем требования СанПиН 2.1.7.2790-10 должны уточняться соответственно рекомендациям МУ 1.3.2569-09.1.3 [11].

И, как уже отмечено выше, особое внимание при организации производства ПЦР-диагностикумов, должно быть уделено мерам, предупреждающим контаминацию реагентов этих наборов. Если ориентироваться на Методические рекомендации Госкомэпиднадзора по работе лабораторий, использующих ПЦР-методы диагностики [10], то во всех операциях контроля качества сырья, полупродуктов, готовых реагентов и конечного продукта производства необходимо учитывать (и, соответственно, сводить к приемлемому минимуму) вероятность как перекрестной контаминации от пробы к пробе (в процессе обработки контролируемых образцов или при раскапывании реакционной смеси), так и контаминации продуктами амплификации (ампликонами), поскольку контаминация посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или поверхности кожи сотрудников лаборатории даже следовыми количествами ампликонов будет чревата искажением результатов контроля качества, т.е. повышением риска выпуска некачественной продукции.

Исходя из рекомендаций о планировке помещений и основных принципах организации работы ПЦР-диагностических лабораторий можно сформулировать следующие рекомендации для проведения контроля качества в технологических процессах производства ПЦР-диагностикумов:

1. Помещения для контрольных исследований должны быть разделены на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-теста. Следует иметь не менее двух комнат:

- пре-ПЦР-помещение, где проводится обработка контролируемых образцов, выделение ДНК, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в дополнительном отдельном помещении); в этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ;

- пост-ПЦР-помещение, где проводится детекция продуктов амплификации.

2. Комнату детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) следует расположить как можно дальше от пре-ПЦР-помещений.

3. Следует исключить движение воздушного потока из пост-ПЦР в пре-ПЦР-помещения.

4. В помещении приготовления реакционной смеси и в помещении обработки контролируемых образцов должны быть установлены настольные боксы с ультрафиолетовыми лампами.

5. Работа в лаборатории должна быть организована в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещению.

6. Каждое помещение для контрольных исследований должно иметь свой набор реагентов, автоматических пипеток, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данном помещении и не выносящихся в другие ПЦР-помещения. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

7. Обработка рабочей одежды из пре- и пост-ПЦР-помещений должна производиться отдельно.

8. Следует однократно использовать перчатки, как в комнате обработки контролируемых образцов, так и в комнате приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР.

9. Необходимо однократно использовать пробирки и наконечники для автоматических пипеток. Обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой с целью предотвращения перекрестной контаминации в процессе выделения ДНК или при раскапывании реакционной смеси.

10. Необходимо использовать наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером (или наконечники с ватными фильтрами, приготовленными в помещении, в котором не ведутся работы с ДНК) при обработке контролируемых образцов, а также при внесении выделенной ДНК в реакционную пробирку.

11. Каждый сотрудник лаборатории должен иметь персональный набор автоматических пипеток и реагентов.

12. В пре-ПЦР и пост-ПЦР-помещениях должны работать разные сотрудники.

13. Контролируемые образцы должны храниться отдельно от реагентов.

14. Не следует использовать водяные бани, т.к. заполняющая их вода, просачиваясь в недостаточно плотно закрытые пробирки, может стать источником контаминации; следует использовать суховоздушные термостаты.

15. Необходимо постоянно поддерживать чистоту на рабочем месте:

- каждое помещение должно иметь свой отдельный набор инвентаря для обработки и уборки рабочего места (ватно-марлевые тампоны, пинцет, 70% этиловый спирт, дезинфицирующий раствор и т.д.), и источники ультрафиолетового излучения, которые эффективно инактивируют ДНК-матрицы.

- при манипуляциях с контролируемым материалом рабочую поверхность до и после исследования обрабатывают 70% этиловым спиртом.

- следует обрабатывать рабочую поверхность в комнате приготовления реакционной смеси до работы 70% этиловым спиртом с целью борьбы с пылью.

16. В помещениях, в которых проводятся контрольные исследования, следует полностью исключить проведение работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности ДНК или фрагментов анализов, для выявления которых предназначен производимый диагностикум.

17. Персонал, выполняющий контрольные исследования должен пройти соответствующее обучение.

18. Для борьбы с контаминацией могут быть использованы следующие методы:

- Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы.

- Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие загрязненные ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1 N HCl, 10% гипохлоритом натрия или 10% хлорной известью).

Поскольку, как уже было отмечено ранее, при производстве реагентов для ПЦР-диагностикумов наибольшую опасность для их качества представляет контаминация реагентов даже следами ампликонов, в качестве мер профилактики такой контаминации могут быть использованы меры, аналогичные тем, что обеспечивают стерильность в производстве лекарственных препаратов, т.е. использовать тот же принцип зонирования производственных помещений – их деление на классы чистоты А, В, С и D [3, 4] с выполнением всех соответствующих требований Правил GMP.

Так, к классу чистоты А должны быть отнесены помещения для взвешивания реактивов, подготовки воды и приготовления стоковых и рабочих растворов для специфических реагентов наборов (ПЦР-смеси, смеси праймеров и зондов, контрольные образцы), помещения для фасовки и укупорки рабочих растворов специфических реагентов наборов. Допускается выполнение всех этих операций в ламинарных боксах 2 класса защиты, размещенных в помещениях класса чистоты В

К классу В должны быть отнесены предбоксы к помещениям класса А, помещения для хранения реактивов, используемых при приготовлении специфических реагентов, с холодильниками/морозильниками (температура 4 °С и минус 20 °С),

К классу С могут быть отнесены помещения для приготовления стоковых и рабочих растворов, необходимых для приготовления неспецифических реагентов, их фасовки и укупорки.

Помещения для подготовки посуды (мойка, сушка, хранение чистой сухой посуды), подготовки воды для приготовления неспецифических реагентов, приготовления дезрастворов, предбоксы перед помещениями класса С для переодевания, хранения одежды, уборочного инвентаря, помещение с холодильниками для хранения стоковых растворов, необходимых для приготовления неспецифических реагентов, помещения для хранения и маркировки

расфасованных и укупоренных реагентов, комплекции наборов, их упаковки в групповую тару, ее маркировки, упаковки в транспортировочную тару и ее маркировки должны быть отнесены к классу чистоты D.

Как показывает практика, такое зонирование технологических помещений при производстве ПЦР-диагностикумов позволяет обеспечивать необходимую защиту производимой продукции от ее контаминации и, соответственно, дает определенные гарантии ее качества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Сборник материалов. Акимкин В.Г., Творогова М.Г., ред. М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; 2020.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. М.: Мир; 2002.
3. Правила надлежащей производственной практики. Утверждены приказом Минпромторга России от 14 июня 2013 г. N 916. <https://base.garant.ru/70451198/>.
4. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». https://svsps.gov.ru/sites/default/files/npa-files/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf.
5. Биологическая безопасность биотехнологических производств: краткий курс лекций для студентов IV курса направления подготовки 240700.62 «Биотехнология». Составители: Попов Ю.А., Осина Т.С. Саратов: ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»; 2016.
6. Замбрицкий О. Н., Бацукова Н.Л. Гигиена труда в аптечных организациях и на предприятиях фармацевтической промышленности: учебно-методическое пособие. 2-е издание. Минск: БГМУ; 2020.
7. Бурак И.И., Юркевич А.Б., Миклис Н.И. Фармацевтическая гигиена. Витебск: ВГМУ; 2018.
8. СП 2.2.1.1312—03. Гигиенические требования к проектированию вновь строящихся и реконструируемых промышленных предприятий: Санитарно-эпидемиологические правила. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003.
9. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. Москва: ООО «ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»; 2012.
10. Методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. М.: Госкомсанэпиднадзор; 1995. <https://mbu.ru/publikaczii/248.html>.
11. МУ 1.3.2569—09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I—IV групп патогенности: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010.
12. Федеральный закон от 30.03.1999 № 52 ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (с изменениями от 30 декабря 2001 г., 10 января, 30 июня 2003 г., 22 августа 2004 г., 9 мая, 31 декабря 2005 г.).
13. Красовитов К.В., Петров В.В. Проблема контаминации реагентов для подготовки и проведения ПЦР бактериальной ДНК и пути её решения. Сборник. Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020. Сборник материалов. Акимкин В.Г., Творогова М.Г., ред. М.: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; 2020; 266.
14. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. СанПиН 2.1.7.2790-10. Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами. Утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 9 декабря 2010 г. № 163. <http://rostoblvvet.ru/wp-content/uploads/2016/09/2.1.7.2790-10.pdf>.

REFERENCES

1. Molecular diagnostics and biosafety - 2020. Collection of materials. Akimkin, M.G. Tvorogova M.G., eds. Moscow: FBUN CNII epidemiologii Rospotrebnadzora; 2020. (in Russian)
2. Glik B., Pasternak D.J. Molecular biotechnology. Principles and application. Transl. from Engl. Moscow: Mir; 2002. (in Russian)
3. Rules of good manufacturing practice. Approved by the order of the Ministry of Industry and Trade of Russia dated June 14, 2013 N 916. <https://base.garant.ru/70451198/>. (in Russian)
4. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission No. 77 dated November 3, 2016 «On Approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union». https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/npa-files/2021/10/22/pravila_nadlezhashchey_proizvodstvennoy_praktiki.pdf. (in Russian)
5. Biological safety of biotechnological productions: a short course of lectures for students of the IV course of the training 240700.62 «Biotechnology». Popov Yu.A., Osina T.S., eds. Saratov: FGBOU VPO «Saratovskiy GAU»; 2016. (in Russian)
6. Zambrzhickiy O. N., Batsukova N.L. Occupational hygiene in pharmacy organizations and pharmaceutical industry enterprises : educational and methodological manual. 2nd ed. Minsk: BGMU; 2020. (in Russian)
7. Burak I.I., Yurkevich A.B., Miklis N.I. Pharmaceutical hygiene. Vitebsk: VGMU; 2018. (in Russian)
8. SP 2.2.1.1312—03. Hygienic requirements for the design of newly constructed and reconstructed industrial enterprises: Sanitary and epidemiological rules.. Moscow: Federal'nyi tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii; 2003. (in Russian)
9. Fundamentals of polymerase chain reaction (PCR). Methodical manual. Moscow: OOO «DNK-TEKHNLOGIYA»; 2012. (in Russian)
10. Methodological recommendations for carrying out work in diagnostic laboratories using the polymerase chain reaction method.. Moscow: Goskomsanepidnadzor; 1995. <https://mbu.ru/publikaczi/248.html>. (in Russian)
11. MU 1.3.2569—09. Organization of work of laboratories using methods of amplification of nucleic acids when working with material containing microorganisms of pathogenicity groups I—IV: Guidelines. Moscow: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2010. (in Russian)
12. Federal Law No. 52 F3 of 30.03.1999 «On Sanitary and Epidemiological welfare of the Population» (as amended on December 30, 2001, January 10, June 30, 2003, August 22, 2004, May 9, December 31, 2005). (in Russian)
13. Krasovitev K.V., Petrov V.V. The problem of contamination of reagents for the preparation and conduct of bacterial DNA PCR and ways to solve it. In the collection of materials «Molecular diagnostics and biosafety - 2020». Akimkin V.G., Tvorogova M.G., eds. Moscow: FBUN CNII epidemiologii Rospotrebnadzora; 2020; 266. (in Russian)
14. Sanitary and epidemiological rules and regulations. SanPiN 2.1.7.2790-10. Sanitary and epidemiological requirements for the treatment of medical waste. Approved. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation No. 163 dated December 9, 2010. <http://rostoblvvet.ru/wp-content/uploads/2016/09/2.1.7.2790-10.pdf>. (in Russian)