ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ МЕДЫЦЫНСКІХ НАВУК. 2023. Т. 20, № 2

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК. 2023. Т. 20, № 2

Журнал основан в 2004 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 393 от 18 мая 2009 г.

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований,
включен в международную базу данных Scopus
и в базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)

Главный редактор

Василий Генрихович Богдан –
Отделение медицинских наук Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

О. О. Руммо (*заместитель главного редактора*) – Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Республика Беларусь
В. Г. Колосовская (*ведущий редактор журнала*)
Ф. И. Висмонт – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
М. А. Герасименко – Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии, Минск, Республика Беларусь
С. В. Губкин – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Г. Л. Гуревич – Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Республика Беларусь
Ю. Е. Еременко – Республиканский научно-практический центр оториноларингологии, Минск, Республика Беларусь

С. Л. Кабак – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Н. П. Канунникова – Гродненский государственный университет имени Янки Купалы, Гродно, Республика Беларусь
С. А. Красный – Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь
Н. П. Митьковская – Республиканский научно-практический центр «Кардиология», Минск, Республика Беларусь
А. Г. Мойсеёнок – Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси, Гродно, Республика Беларусь
С. П. Рубникович – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Р. Р. Сидорович – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Республика Беларусь
А. В. Строцкий – Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
Л. П. Титов – Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

Эдуардас Алекнавичиус – Национальный институт рака, Вильнюс, Литовская Республика
Ю. В. Вороненко – Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, Киев, Украина
Марк М. Ван Гулле – Университет Лёвена, Лёвен, Королевство Бельгия
Драган Дьюрич – Институт медицинской физиологии Ричарда Бьюриана Университета Белграда, Белград, Республика Сербия
Т. П. Клюшник – Научный центр психического здоровья, Москва, Российская Федерация
В. А. Кульчицкий – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Марк-Антуан Кусто – Анжерский университет, Анже, Французская Республика
А. И. Мартынов – Медицинский центр Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Российская Федерация
Н. Д. Савенкова – Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия, Санкт-Петербург, Российская Федерация
В. И. Стародубов – Российская академия наук, Москва, Российская Федерация
М. В. Угрюмов – Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
И. А. Чешик – Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

Адрес редакции:
ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.
Сайт: vestimed.belnauka.by.

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.
Серия медицинских наук. 2023. Т. 20, № 2.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 15.05.2023. Выход в свет 29.05.2023. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 42 экз. Заказ 95.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,66 руб., ведомственная подписка – 29,74 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:
Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук, 2023

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MEDICAL SERIES, 2023, vol. 20, no. 2

The Journal was founded in 2004

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 393

The Journal is included in The List of Journals for Publication of the Results of Dissertation Research in the Republic of Belarus, in the Scopus international database and in the Russian Science Citation Index (RSCI) database

E d i t o r - i n - C h i e f

Vasily G. Bogdan –
Department of Medical Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l B o a r d

Oleg O. Rummo (*Associate Editor-in-Chief*) – Minsk Scientific-Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology, Minsk, Republic of Belarus
Valentina G. Kolosovskaya (*Managing Editor*)
Yulia E. Eremenko – Republican Center for Research and Practice in Otolaryngology, Minsk, Republic of Belarus
Mikhail A. Gerasimenko – Republican Scientific-Practical Center of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus
Gennady L. Gurevich – Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Tuberculosis, Minsk, Republic of Belarus
Siarhei V. Hubkin – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Sergey L. Kabak – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
Nina P. Kanunnikova – Yanka Kupala State University of Grodno, Grodno, Republic of Belarus
Siarhei A. Krasny – N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Minsk, Republic of Belarus
Natalya P. Mitkovskaya – Republican Scientific and Practical Center "Cardiology", Minsk, Republic of Belarus
Andrey G. Moiseenok – Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus
Sergey P. Rubnikovich – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
Ryszard R. Sidorovich – Republican Research and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Republic of Belarus
Alexander V. Strotsky – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Leonid P. Titov – Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus
Frantishek I. Vismont – Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Editorial Council

Eduardas Aleknavicius – National Cancer Institute, Vilnius, Republic of Lithuania
Igor A. Cheshik – Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Mark-Antoine Custaud – University of Angers, Angers, French Republic
Dragan Djuric – Richard Buryan Medical Physiology Institute of the University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia
Mark M. Van Hulle – University of Leuven, Leuven, Kingdom of Belgium
Tatiana P. Klyushnik – Mental Health Research Center, Moscow, Russian Federation
Vladimir A. Kulchitsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Anatoly I. Martynov – Medical Center of the Administration of the President of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation
Nadezhda D. Savenkova – St. Petersburg State Pediatric Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation
Vladimir I. Starodubov – Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Mikhail V. Ugryumov – Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Yuri V. Voronenko – National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupik, Kyiv, Ukraine

Address of the Editorial Office:
1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: + 375 17 272-19-19; e-mail: medvesti@mail.ru.
Website: vestimed.belnauka.by.

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Medical series, 2023, vol. 20, no. 2.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

It is sent of the press 15.05.2023. Appearance 29.05.2023. Format 60×84 $^{1}/_{8}$. Offset paper. The press digital.
Printed pages 10.23. Publisher's signatures 11.3. Circulation 42 copies. Order 95.
Number price: individual subscription – 12.66 byn., departmental subscription – 29.74 byn.

Publisher and printing execution:
Republican unitary enterprise "Publishing House "Belaruskaya Navuka"
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions
No. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press No. 02330/455 dated December 30, 2013.
Address: 40, F. Skorina Str., Minsk, 220084, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series, 2023

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

ЗМЕСТ

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

Матюкевич М. Ч., Снежицкий В. А., Степуро Т. Л. Связь полиморфных вариантов генов *NPPB* rs198389 и *NPPA* rs5068 с уровнем натрийуретических пептидов и прогрессированием сердечной недостаточности у пациентов с фибрилляцией предсердий 95

Мельниченко Ю. М., Кабак С. Л., Саврасова Н. А., Мехтиев Р. С. Эктопия зубов в верхнечелюстную пазуху (*на англ. яз.*) 106

Таганович А. Д., Ковганко Н. Н., Прохорова В. И., Колб А. В., Готько О. В. Значимость фрагмента цитокератина-19 и рецепторов CXCR1, CXCR2 в крови для прогнозирования безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией немелкоклеточного рака легкого 112

Кузнецов О. Е. Взаимосвязь экспрессии протеинов NF1, p53, bcl-2, pRB с ДНК/РНК вирусов и мутациями генов *BRCA 1/2* and *hMSH2* при раке печени 126

Трофименко А. С., Емельянова О. И., Русанова О. А. Клинико-иммунологическое значение определения антител к I, II, III типам коллагена и эластину при системной склеродермии 140

Висмонт Ф. И., Висмонт А. Ф., Жадан С. А., Абакумова Т. В., Яковлев Ф. Д. Об участии валина крови и L-аргинин-NO системы в развитии гипертермии, формировании тиреоидного статуса и прооксидантно-антиоксидантного состояния при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином 147

Слизень В. В., Суркова Л. К., Гуревич Г. Л. Использование ПЦР с гидролизными зондами для выявления мутаций устойчивости к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis* 158

Даниелова Б. Г., Персин Л. С., Постников М. А., Рубникович С. П., Денисова Ю. Л., Панкратова Н. В., Родионова А. А., Постникова Е. М. Оценка состояния зубочелюстной системы у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией по данным телерентгенограмм головы в боковой проекции с использованием внеротовых параметров 168

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

CONTENTS

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

Matsiukevich M. Ch., Snezhitskiy V. A., Stepuro T. L. Association of *NPPB* rs198389 and *NPPA* rs5068 single-nucleotide polymorphisms with natriuretic peptide levels and heart failure progression risks in patients with atrial fibrillation 95

Melnichenko Y. M., Kabak S. L., Savrasova N. A., Mekhtiev R. S. Ectopic teeth in the maxillary sinus 106

Tahanovich A. D., Kauhanka N. N., Prokhorova V. I., Kolb A. V., Got'ko O. V. Significance of the cytokeratin-19 fragment and CXCR1, CXCR2 receptors in the blood for prediction of the relapse-free survival of patients with stage III non-small cell lung cancer..... 112

Kuzniatsou A. E. Relationship of the expression of the NF1, p53, bcl-2, pRB proteins with DNA/RNA of viruses and mutations of the *BRCA 1*/*2* and *hMSH2* genes in liver cancer..... 126

Trofimenko A. S., Emelyanova O. I., Rusanova O. A. Clinical and immunological significance of quantification of antibodies to type I, II, III collagen and elastin in systemic scleroderma..... 140

Vismont F. I., Vismont A. F., Zhadan S. A., Abakumova T. V., Yakovlev F. D. Participation of blood valine and L-arginine-NO system in the development of hyperthermia, the formation of thyroid status and prooxidant-antioxidant state under stress due to bacterial endotoxin..... 147

Slizen V. V., Surkova L. K., Gurevich G. L. PCR with hydrolysis probes for detection of fluoroquinolone resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* 158

Danielova B. G., Persin L. S., Postnikov M. A., Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Pankratova N. V., Rodionova A. A., Postnikova E. M. Assessment of the state of maxillofacial system in persons 7–15 years old with normal occlusion according to cephalometric X-ray using extraoral parameters..... 168

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE

УДК 575.174.015.3:577.112.6:[616.12-008.46+616.12-008.313.2]
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-95-105

Поступила в редакцию 26.09.2022
Received 26.09.2022

М. Ч. Матюкевич, В. А. Снежицкий, Т. Л. Степуро

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *NPPB* rs198389 И *NPPA* rs5068 С УРОВНЕМ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ

Аннотация. Натрийуретические пептиды (НУП) являются сильнейшими предикторами неблагоприятного исхода у пациентов с сердечной недостаточностью (СН). Однонуклеотидные полиморфные варианты (Single Nucleotide Polymorphysms (SNPs) rs198389 гена *NPPB* и rs5068 гена *NPPA* ассоциированы с измененными уровнями НУП. Однако не определена роль SNPs генов-кандидатов в активности системы НУП у лиц с СН и фибрилляцией предсердий (ФП), а также не установлена связь ассоциации SNPs *NPPA/NPPB* с риском возникновения сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов данной группы.

Целью исследования было установить распределение частот аллелей и генотипов SNPs rs5068 *NPPA* и rs198389 *NPPB* в селективной выборке белорусской популяции, определить связь данных SNPs с концентрацией компонентов системы НУП, а также оценить прогностическую значимость данных SNPs в отношении риска госпитализации по причине прогрессирования СН у пациентов с СН и постоянной формой ФП.

В исследовании приняли участие 187 пациентов. В основную группу были включены 152 пациента с СН и фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) < 50 %. В группу 1 вошли 48 пациентов с СН и ФП, в группу 2 – 51 пациент с СН и синусовым ритмом (СР), в контрольную группу – 35 человек. Определены уровни предсердного и мозгового натрийуретических пептидов (ANP и BNP) и N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP). Проведено генетическое тестирование полиморфных локусов rs5068 гена *NPPA* и rs198389 гена *NPPB*. Первичной конечной точкой в исследовании определена госпитализация по причине прогрессирования СН.

Средний период наблюдения составил 12,1 [от 9 до 14] мес. Распределение частот генотипов и аллелей SNPs rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* у пациентов с СН с ФВ ЛЖ < 50 % сопоставимо с таковым у лиц, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями. У пациентов с СН и ФВ ЛЖ < 50 % и постоянной формой ФП минорный аллель С rs198389 *NPPB* ассоциирован с более высоким уровнем BNP, чем у пациентов с СН и СР (542 [333,7; 909,4] пг/мл против 247,3 [244; 365,2] пг/мл; $p < 0,05$), но при этом не зависит от уровня NT-proBNP. У пациентов с СН и постоянной формой ФП уровень ANP не ассоциирован с rs5068 *NPPA*. Частота встречаемости аллеля Т rs198389 *NPPB* у госпитализированных пациентов была значимо ниже, чем у лиц, которые не были госпитализированы (22 (44 %) пациента против 83 (62 %); $p = 0,04$). Присутствие в генотипе аллеля С rs198389 *NPPB* ассоциировано с более высоким риском прогрессирования СН у пациентов с СН и ФП (отношение шансов = 2,071 [95 % ДИ – 1,072…4,001]; $p < 0,05$).

Ключевые слова: *NPPB*, *NPPA*, BNP, ANP, NT-proBNP, сердечная недостаточность, фибрилляция предсердий, госпитализация

Для цитирования: Матюкевич, М. Ч. Связь полиморфных вариантов генов *NPPB* rs198389 и *NPPA* rs5068 с уровнем натрийуретических пептидов и прогрессированием сердечной недостаточности у пациентов с фибрилляцией предсердий / М. Ч. Матюкевич, В. А. Снежицкий, Т. Л. Степуро // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 95–105. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-95-105

Marina Ch. Matsiukevich, Victor A. Snezhitskiy, Tatsiana L. Stepuro

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

ASSOCIATION OF *NPPB* rs198389 AND *NPPA* rs5068 SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS WITH NATRIURETIC PEPTIDE LEVELS AND HEART FAILURE PROGRESSION RISKS IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION

Abstract. Natriuretic peptides (NUPs) are the strongest predictors of poor prognosis in patients with heart failure (HF). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rs198389 of the NPPB gene and rs5068 of the *NPPA* gene are associated with altered levels of NUP. The role of candidate gene polymorphisms in the activity of the NUP system and the association of *NPPA*/

© Матюкевич М. Ч., Снежицкий В. А., Степуро Т. Л., 2023

NPPB SNPs with the risk of cardiovascular disease (CVD) in individuals with HF and atrial fibrillation (AF) is not well understood.

The study aims to evaluate the allele and genotype frequencies of *NPPA* rs5068 and *NPPB* rs198389 SNPs in a selective sample of the Belarusian population, to determine the relationship of these SNPs with NUP concentrations, and to assess the prognostic significance of these SNPs on the risk of HF hospitalization in patients with HF and permanent AF.

The study involved 187 patients. The main group included 152 patients with HF with left ventricular ejection fraction (LVEF) < 50 %. Group 1 included 48 patients with HF and AF; group 2 – 51 patients with HF and sinus rhythm (SR) and 35 patients in the control group. The levels of atrial and brain natriuretic peptides (ANP and BNP) and the N-terminal fragment of the brain natriuretic peptide (NT-proBNP) were determined. A genetic testing of polymorphic loci of the rs5068 *NPPA* gene and the rs198389 *NPPB* gene was performed. The primary endpoint of the study was hospitalization due to HF progression.

The average observation period was 12.1 [from 9 to 14] months. The distribution of the genotype and allele frequencies of rs198389 *NPPB* and rs5068 *NPPA* in HF patients with LVEF < 50 % is comparable to that in individuals without CVD. In patients with HF and persistent AF, the minor allele C rs198389 NPPB is associated with higher BNP levels compared to patients with HF and SR (542 [333.7; 909.4] pg/ml versus 247.3 [244; 365.2] pg/ml; $p < 0.05$), but it has no relationship with the NT-proBNP level. In patients with HF and permanent AF, the ANP levels are not associated with rs5068 *NPPA*.

The frequency of the T allele rs198389 *NPPB* in hospitalized patients was significantly lower compared to patients who were not hospitalized (22 patients (44 %) versus 83 patients (62 %); $p = 0.04$). The presence of the C allele rs198389 *NPPB* was associated with a higher risk of HF progression in patients with HF and AF, the odds ratio (OR) = 2.071 [95 % CI from 1.072 to 4.001], $p < 0.05$.

Keywords: *NPPB*, *NPPA*, BNP, ANP, NT-proBNP, heart failure, atrial fibrillation, hospitalization

For citation: Matsiukevich M. Ch., Snezhitskiy V. A., Stepuro T. L. Association of *NPPB* rs198389 and *NPPA* rs5068 single-nucleotide polymorphisms with natriuretic peptide levels and heart failure progression risks in patients with atrial fibrillation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 95–105 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-95-105

Введение. Фибрилляция предсердий (ФП) и сердечная недостаточность (СН) – два часто ассоциированных друг с другом состояния, распространенность которых в развитых странах стремительно увеличивается. Для обоих состояний наличие натрийуретических пептидов (НУП) как маркеров повышенной нагрузки на миокард левого желудочка является сильнейшим предиктором неблагоприятного исхода [1, 2]. НУП регулируют уровень артериального давления, объем циркулирующей крови и общее периферическое сосудистое сопротивление посредством диуретического и вазодилатирующего эффектов, влияя также на процессы ремоделирования миокарда и сосудов. Субстраты системы НУП, предсердный натрийуретический пептид (atrial natriuretic peptide (ANP)) и мозговой натрийуретический пептид (brain natriuretic peptide (BNP)) являются сердечными гормонами, секретируемыми миокардом предсердий и желудочков соответственно. Они активно изучаются как биомаркеры, и в контексте таких состояний, как СН и ФП, их постоянное повышение отражает увеличение давления в полостях сердца и процессы прогрессирующего ремоделирования миокарда [3, 4].

Несмотря на то что НУП являются значимыми диагностическими и прогностическими маркерами для СН и ФП, их роль и вклад в патогенез этих заболеваний противоречив и недостаточно изучен. Временная связь между повышением концентрации НУП и развитием заболевания или его прогрессированием не изучена. Более того, не ясно, является ли взаимосвязь ANP, BNP и N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) с ФП и СН идентичной.

Структура ANP не имеет межвидовых различий, в то время как первичная структура BNP вариабельна и на основании результатов полногеномных ассоциативных исследований (*англ.* GWAS, Genome-Wide Association Studies) доказано наличие взаимосвязи между генетической изменчивостью генов *NPPA* и *NPPB* (кодирующих ANP и BNP соответственно) и сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ). Однако механизм, с помощью которого реализуется связь генов с уровнями НУП и прогнозом, изучен слабо. В нескольких крупных когортных исследованиях был определен ряд однонуклеотидных полиморфных вариантов (Single Nucleotide Polymorphysms (SNPs), в том числе SNPs rs198389 гена *NPPB* и rs5068 гена *NPPA*, которые ассоциированы с более высокими уровнями BNP и ANP соответственно [5]. Однако неизвестно, имеется ли ассоциация SNPs *NPPA/NPPB* с риском сердечно-сосудистых событий, существует ли связь между генотипом и концентрацией НУП у лиц с СН и ФП, а в целом – какова роль генетического полиморфизма генов-кандидатов в активности системы НУП.

Цель исследования – оценить распределение частот аллелей и генотипов SNPs rs5068 гена *NPPA* и rs198389 гена *NPPB* в селективной выборке белорусской популяции, определить связь данных SNPs с концентрацией натрийуретических пептидов, а также установить прогностическую значимость данных SNPs в отношении риска госпитализации по причине прогрессирования сердечной недостаточности у пациентов с сердечной недостаточностью и фибрилляцией предсердий.

Материалы и методы исследования. Всего в исследовании приняли участие 187 пациентов. В основную группу были включены 152 пациента с СН и фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) <50 % на фоне ишемической болезни сердца (ИБС), в контрольную группу вошли 35 лиц, сопоставимых по полу и возрасту, не имеющих ССЗ.

Критерии включения в основную группу: документально зафиксированная манифестация СН в течение не менее 3 мес. до момента включения в исследование (диагноз ИБС был верифицирован при наличии ≥50 % стеноза коронарной артерии по данным коронарографии), постоянная или длительно персистирующая (более 12 мес.) форма ФП.

Критерии невключения в основную группу: пароксизмальная форма ФП, острый инфаркт миокарда (ИМ) или ИМ давностью менее 6 мес. в анамнезе, прогрессирующая стенокардия напряжения, стеноз коронарной артерии >90 %, миокардит, СН в стадии декомпенсации, структурные заболевания клапанов, оперированные клапанные пороки любой локализации, выраженная почечная недостаточность (скорость клубочковой фильтрации (СКФ) <30 мл/мин/м^2), изменения уровня гормонов щитовидной железы и электролитные нарушения.

Количественное определение уровней ANP, BNP и N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) в сыворотке венозной крови проводили с помощью наборов для иммуноферментного анализа Human ANP ELISA Kit, Human BNP ELISA Kit, Human NT-proBNP ELISA Kit, Human MME (Neprilysin) ELISA Kit соответственно. Методика выполнена согласно инструкции, предоставленной производителем. Ожидаемые нормальные значения: для ANP – 50–200 пг/мл, для BNP – 0–30, для NT-proBNP – 0–125 пг/мл.

Генетическое исследование полиморфных локусов rs5068 гена *NPPA* и rs198389 гена *NPPB* осуществляли с помощью прибора для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени Rotor-Gene Q-5 (PLEX HRM), используя реагенты TaqMan MasterMix и TaqMan SNP Genotyping Assays (США). Методика выполнена согласно инструкции, предоставленной производителем.

Первичной конечной точкой в исследовании определена госпитализация по причине прогрессирования СН. Критериями прогрессирования СН являлись нарастание клинических симптомов СН; повышение функционального класса СН по New York Heart Association в сочетании с повышением концентрации N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP).

Для статистической обработки данных использовали пакет статистических программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США) и StatTech v. 2.6.5 (ООО «Статтех», Россия), для сравнительного анализа частот генотипов и аллелей у разных групп пациентов – точный критерий Фишера. Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе обследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе обследуемых более 50). Описательные статистики численных показателей были представлены в виде Me [Lq; Uq], где Me – медиана [Lq – 25-й процентиль; Uq – 75-й процентиль]. Сравнение показателей между двумя группами проводилось при помощи непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни, между тремя и более группами – с использованием непараметрического *H*-критерия Краскела–Уоллеса. Качественные показатели в группах описывали при помощи абсолютной (*n*) и относительной (%) частот встречаемости. Пороговое значение уровня статистической значимости было принято равным 0,05.

Все участники подписали информированное согласие на участие в исследовании. Этапы исследования соответствовали стандартам Хельсинской декларации. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

Результаты и их обсуждение. Всего в исследовании приняли участие 187 пациентов, среди которых 158 (84,5 %) были лицами мужского пола (средний возраст 59 [53; 63] лет). На перво-

начальном этапе в выборке с помощью онлайн-калькулятора выполнен расчет соответствия распределения аллелей и генотипов равновесию Харди–Вайнберга. Полученные значения (для rs198389 *NPPB* – $\chi^2 = 0{,}7$, для rs5068 *NPPA* – $\chi^2 = 0{,}9$) свидетельствуют о выполнении условий данного равновесия и дают возможность интерпретировать результаты обследования данной выборки. Распределение частот генотипов и аллелей rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* в общей выборке представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. **Распределение частот генотипов и аллелей изучаемых однонуклеотидных полиморфных вариантов, *n* (%)**

T a b l e 1. **Genotype and allele frequencies of the studied single-nucleotide polymorphisms, *n* (%)**

Полиморфный вариант	Показатель
Генотип (*n* = 187)	
rs198389 *NPPB*:	
TT	59 (31,5)
TC	97 (52)
CC	31 (16,5)
rs5068 *NPPA*:	
AA	163 (87)
AG	24 (13)
GG	0 (0)
Аллель (*n* = 374)	
rs198389 *NPPB*:	
T	215 (57,5)
C	159 (42,5)
rs5068 *NPPA*:	
A	350 (94)
G	24 (6)

Частота встречаемости минорных аллелей SNPs rs198389 (C) и rs5068 (G) составили 42,5 и 6 % соответственно. В исследовании EPIC-Norfolk в общей популяции из 25 639 человек, проживающих в Великобритании, частоты минорных аллелей SNPs rs198389 (C) *NPPB* и rs5068 (G) *NPPA* составили 42,5 и 5,2 % соответственно [6]. В исследовании ARIC [7], в котором участвовали 15 792 человека из США, распределение частот генотипов TT/TC/CC rs198389 *NPPB* составило 34, 48 и 18 % соответственно и не отличалось от аналогичного показателя у афроамериканцев и светлокожих пациентов. Для rs5068 *NPPA* распределение частот генотипов AA/AG/GG в выборке из США и Центральной Европы составили 93,5; 6,4; 0,1 % соответственно [8, 9]. На основании полученных нами результатов можно сделать вывод о том, что белорусская популяция характеризуется аналогичным распределением частот генотипов и аллелей rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA*, что и западноевропейская и американская популяции.

Средний возраст пациентов в основной группе с СН с ФВ ЛЖ < 50 % составил 60 [54; 64] лет и был сопоставим с возрастом лиц контрольной группы (57 [54; 60] лет). Количество пациентов мужского пола в группах не различалось: 129 (84,9 %) в исследуемой группе и 29 (82,8 %) в контрольной. Распределение частот генотипов и аллелей SNPs rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* у пациентов контрольной и опытной групп достоверно не отличалось (табл. 2).

Несмотря на то что нами не оценивался проспективно риск развития СН в зависимости от генотипа, полученные результаты согласуются с данным проспективного популяционного исследования EPIC-Norfolk [6], в котором у 23 192 участников за 12 лет наблюдения не было установлено значимой связи между генотипами и аллелями rs198389 *NPPB*, rs5068 *NPPA* и риском развития СН у лиц с ИБС и без нее.

Из 152 пациентов основной группы 92 (60,5 %) имели постоянную или длительно персистирующую форму ФП и были включены в группу 1, а 60 (39,5 %) пациентов с синусовым ритмом были включены в группу 2.

В проведенном нами исследовании распределения частот генотипов и аллелей rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* в группе с СН и ФВ ЛЖ < 50 % в сочетании с ФП не различаются в сравнении с таковыми у пациентов с СН и синусовым ритмом и у лиц, не страдающих ССЗ (табл. 3).

Т а б л и ц а 2. **Распределение генотипов и аллелей SNPs в основной и контрольной группах, *n* (%)**

T a b l e 2. **Comparison of the genotype and allele distribution of the studied SNPs in the main and control groups, *n* (%)**

Показатель	СН с ФВ ЛЖ < 50 % (генотип – *n* = 152, аллель – *n* = 304)	Контроль (генотип – *n* = 35, аллель – *n* = 70)
rs198389 *NPPB*		
TT	46 (30,3)	13 (37,1)
TC	82 (53,9)	15 (42,9)
CC	24 (15,8)	7 (20)
Аллель C	130 (42,8)	29 (41,4)
rs5068 *NPPA*		
AA	134 (88,2)	29 (82,9)
AG	18 (11,8)	6 (17,1)
GG	0 (0)	0 (0)
Аллель G	18 (5,9)	6 (8,6)

Т а б л и ц а 3. **Распределение частот генотипов и аллелей в изучаемых группах, *n* (%)**

T a b l e 3. **Comparison of the genotype and allele frequencies of SNPs in the studied groups, *n* (%)**

Показатель	СН с ФВ ЛЖ < 50 % и СР (генотип – *n* = 60, аллель – *n* = 120)	СН с ФВ ЛЖ < 50 % и ФП (генотип – *n* = 92, аллель – *n* = 184)	Контроль (генотип– *n* = 35, аллель – *n* = 70)
rs198389 *NPPB*			
TT	18 (30)	28 (30,4)	13 (37,1)
TC	33 (55)	49 (53,3)	15 (42,9)
CC	9 (15)	15 (16,3)	7 (20)
Аллель C	51 (42,5)	79 (42,9)	29 (41,4)
rs5068 *NPPA*			
AA	54 (90)	80 (87)	29 (82,9)
AG	6 (10)	12 (13)	6 (17,1)
GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Аллель G	6 (5)	12 (6,5)	6 (8,6)

Период наблюдения пациентов основной группы с СН с ФВ ЛЖ < 50 % составил 12,1 [от 9 до 14] мес. Всего за период наблюдения по причине прогрессирования СН было госпитализировано 34 (22,4 %) пациента, из них 25 (73,5 %) с ФП. Распределение частот генотипов и аллелей rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* в группах пациентов с СН и ФП, госпитализированных и негоспитализированных из-за прогрессирования СН, представлено в табл. 4.

Частота встречаемости аллеля T rs198389 *NPPB* у госпитализированных пациентов была значимо ниже, чем у лиц, которые не были госпитализированы (22 (44 %) пациента против 83 (62 %) соответственно; $p = 0,04$). Присутствие в генотипе аллеля C полиморфного маркера rs198389 *NPPB* было ассоциировано с более высоким (двукратным) риском прогрессирования СН у пациентов с СН и ФП (отношение шансов (ОШ) = 2,071 [95 % ДИ – 1,07…4,001]; $p < 0,05$).

При оценке зависимости уровня НУП в крови от носительства указанных полиморфных вариантов генов у пациентов основой группы выявлено, что при носительстве генотипа CC rs198389 *NPPB* уровень BNP в плазме крови значимо выше, чем у пациентов с генотипами TC и TT rs198389 *NPPB*. Уровни NT-proBNP у пациентов с СН также значимо различались в зависимости от генотипа. Так, у пациентов с генотипом TT rs198389 *NPPB* он был значимо более низким, чем у носителей генотипа TC rs198389 *NPPB*, и более существенно отличался от такового у носителей генотипа CC rs198389 *NPPB* (табл. 5).

Таким образом, пациенты с гомозиготным минорным генотипом CC rs198389 имели значимо более высокий уровень содержания BNP по сравнению с остальными генотипами. В то же время уровень NT-proBNP возрастал пропорционально количеству в генотипе аллелей C полиморфного

Т а б л и ц а 4. **Распределение частот генотипов и аллелей в зависимости от наступления исхода у пациентов с СН и ФП, *n* (%)**

T a b l e 4. **Comparison of the genotype and allele frequencies of SNPs depending on the onset of outcome in patients with HF and AF, *n* (%)**

Показатель	СН + ФП (*n* = 92)	
	Госпитализированные (генотип – *n* = 25, аллель – *n* = 50)	Негоспитализированные (генотип – *n* = 67, аллель – *n* = 134)
rs198389 *NPPB*		
TT	4 (16)	24 (36)
TC	14 (56)	35 (52)
CC	7 (28)	8 (12)
Аллель T	22 (44)*	83 (62)
Аллель C	28 (56)*	51 (38)
rs5068 *NPPA*		
AA	23 (92)	57 (85)
AG	2 (8)	10 (15)
GG	0 (0)	0 (0)
Аллель G	2 (4)	10 (7,5)

П р и м е ч а н и е. * – $p = 0{,}04$.

Т а б л и ц а 5. **Уровень НУП в зависимости от генотипа rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* у пациентов с СН**

T a b l e 5. **NUP levels depending on the rs198389 *NPPB* and rs5068 *NPPA* genotype in patients with HF**

Показатель	rs198389 *NPPB*			rs5068 *NPPA*	
	TT	TC	CC	AA	AG
BNP, пг/мл	246,4 [242,4; 380,8]	276,5 [242,3; 574,5]	418 [261,4; 1096]*#		
NT-proBNP, пг/мл	889,5 [473,6; 1124]	1074,7 [600; 2948,5]&	1573 [746; 3663]&		
ANP, пг/мл				163,5 [142; 223,5]	166,6 [143,2; 215,7]

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий: &, # – по отношению к пациентам с генотипом TT ($p < 0{,}05$ и $p < 0{,}005$ соответственно); * – по отношению к пациентам с генотипом TC ($p < 0{,}05$).

маркера rs198389 гена *NPPB*. Зависимость между уровнем ANP в крови и генотипом rs5068 *NPPA* в основной группе не выявлена.

Для сравнительной оценки связи SNPs rs198389 *NPPB* с концентрацией НУП в зависимости от генотипа и типа основного ритма пациенты были разделены на две группы: группа 1 – пациенты с СН и синусовым ритмом (СР); группа 2 – пациенты с СН и ФП. У пациентов с СН генотип TT rs198389 ассоциирован со значимо более низкими уровнями BNP независимо от наличия у пациентов ФП. В то же время у пациентов с СН и ФП, носителей генотипов TT и TC, отмечалось значимо более высокое содержание BNP в крови, чем у пациентов – носителей того же генотипа, но не имеющих нарушений ритма работы предсердий. Пациенты с СН и синусовым ритмом, носители генотипа TT rs198389, имели значимо более низкие уровни NT-proBNP, в то время как у пациентов с СН и ФП связи между уровнем NT-proBNP и генотипом не обнаружено (табл. 6). Однако содержание NT-proBNP у пациентов с ФП, носителей TT генотипа, оказалось значимо выше аналогичного показателя у носителей генотипа TT, имеющих нормальный синусовый ритм.

Полученные данные согласуются с результатами исследований ученых из Новой Зеландии [7, 10], установивших аналогичную связь между генотипами rs198389 гена *NPPB* и уровнем BNP у пациентов с ИБС, а также с данными японских исследователей, которыми выявлена обратная корреляционная связь между количеством аллелей T в генотипе и уровнем BNP [11, 12].

Т а б л и ц а 6. **Уровни НУП у пациентов с СН в зависимости от генотипа rs198389 *NPPB*, rs5068 *NPPA* и наличия ФП**

T a b l e 6. **NUP levels in HF patients depending on the rs198389 *NPPB*, rs5068 *NPPA* genotype and the presence of AF**

Показатель	Группа 1 (СН + СР)	Группа 2 (СН + ФП)
rs198389 *NPPB*:	BNP, пг/мл	
TT	105,6 [95; 245]*	247,3 [244,6; 365,2]#$▲
TC	153 [102,8; 408,2]	346,7 [248,1; 574,5]▲
CC	651 [276; 1064,8]	450,8 [307,6; 1909,4]
rs198389 *NPPB*:	NT-proBNP, пг/мл	
TT	770 [331; 915]*	938 [559,8; 1681,8]▲
TC	894,6 [506; 1385]	1251 [873; 3185]
CC	1692 [983; 2599]	1454 [992; 3988]
rs5068 *NPPA*:	ANP, пг/мл	
AA	147 [131,2; 166,8]	180 [148,6; 252,6]
AG	149 [138,7; 221]	166,6 [142,7; 203,5]

П р и м е ч а н и е. Статистически значимые различия: * – с пациентами с СС внутри группы 1, $p < 0,05$; # – с пациентами с ТС внутри группы 2, $p < 0,01$; $ – с пациентами с СС внутри группы 2, $p < 0,001$; ▲ – между пациентами с таким же генотипом ($p < 0,05$).

В представленном нами исследовании у пациентов с СН и ФП наличие минорного аллеля С rs198389 *NPPB* ассоциировано с более высоким уровнем BNP, при этом связь с уровнем NT-proBNP отсутствовала (табл. 7). Наблюдаемую ассоциацию между rs198389 и концентрацией НУП можно объяснить полученными ранее данными о том, что аллель С rs198389 связан с более высокой активностью промотора *NPPB* [13].

Т а б л и ц а 7. **Концентрация BNP и NT-proBNP в зависимости от наличия минорного аллеля (С) rs198389 *NPPB* у пациентов с СН и ФП**

T a b l e 7. **BNP and NT-proBNP levels depending on the presence of the allele (C) rs198389 *NPPB* in patients with HF and AF**

Показатель	rs198389 *NPPB*	
	Присутствие аллеля С в генотипе (С+)	Отсутствие аллеля С в генотипе (С–)
BNP, пг/мл	355 [248,6; 607,3]*	247,3 [244; 365,2]
NT-proBNP, пг/мл	1258 [873; 3185]	938 [559,7; 1681,8]

П р и м е ч а н и е. * – статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

Основываясь на представленных выше данных о влиянии минорного аллеля С rs198389 на повышение риска госпитализации у пациентов с СН и ФП, было решено проверить, связано ли носительство аллеля С с уровнями BNP и NT-proBNP у госпитализированных пациентов. Оказалось, что наличие в генотипе минорного аллеля ассоциировано только с повышенным уровнем BNP у пациентов с СН и ФП, которые были госпитализированы в связи с прогрессированием СН (табл. 8).

Существующие предположения о значимости генотипа *NPPA/NPPB* с исходом ССЗ достаточно ограничены и противоречивы. В некоторых исследованиях сообщается о связи SNPs rs5068 *NPPA* с прогрессированием артериальной гипертензии, а также о связи rs198389 *NPPB* с риском развития СН и продолжительностью жизни [13]. Некоторые рабочие группы, напротив, не обнаружили связь rs198389 *NPPB* с риском развития неблагоприятного сердечно-сосудистого события [6].

В настоящий момент представлен ряд противоречивых исследований о роли rs198389 *NPPB* в оценке риска развития и прогрессирования СН. Согласно результатам исследования G. Zakirova

Т а б л и ц а 8. **Уровни BNP и NT-proBNP в зависимости от наличия минорного аллеля (С) rs198389 *NPPB* у пациентов с СН и ФП, госпитализированных за период наблюдения**

T a b l e 8. **BNP and NT-proBNP levels depending on the allele (C) rs198389 *NPPB* presence in hospitalized patients with HF and AF**

Показатель	rs198389 *NPPB*	
	присутствие аллеля С в генотипе (С+)	отсутствие аллеля С в генотипе (С–)
BNP, пг/мл	542 [333,7; 909,4]*	247,6 [246,6; 369,1]
NT-proBNP, пг/мл	3338 [1348; 4885]	2118,5 [1447; 3256]

П р и м е ч а н и е. * – статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

с соавт. [14], у лиц узбекской национальности разница в распределении частоты неблагоприятного аллеля С между пациентами с хронической СН и лицами контрольной группы характеризовалась ее значимым увеличением в 1,4 раза в группе пациентов с СН. Кроме того, в группе пациентов с СН по сравнению с контрольной группой наблюдалось значимое снижение благоприятного генотипа ТТ rs198389 *NPPB* в 1,2 раза и увеличение неблагоприятных генотипов ТС и СС rs198389 *NPPB* в 1,5 раза. В противоположность этим данным в исследованиях S. B. Seidelmann с соавт. [7] и по итогам реализации программы последующего наблюдения STOP-HF [15] путем генотипирования по rs198389 *NPPB*, несмотря на то что минорный аллель С также был связан с более высоким уровнем NT-proBNP, его присутствие было ассоциировано с более низким риском развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий, что на сегодняшний день активно оспаривается [16–18].

Противоречивость данных об ассоциации минорного аллеля С rs198389 *NPPB* с более высокими концентрациями BNP и NTproBNP и более благоприятным прогнозом исследователи объясняют различными механизмами. Некоторые авторы считают, что повышенный уровень BNP и NT-proBNP активация рецепторов NPR-A способствуют формированию определенного фенотипа СН [7]. Возможно также, что данное явление связано с измененными процессами нейрогуморальной регуляции у пациентов с развившейся СН, т. е., не оказывая влияния на риск развития СН, они могут усугублять течение СН на фоне развившегося ССЗ. У пациентов с СН синтез и секреция НУП повышены, но путь метаболизма значительно нарушен. У пациентов с СН процессы нейрогуморальной регуляции, основную роль в которой играют воспалительные цитокины, гормоны и нейротрансмиттеры, могут нивелировать или свести к минимуму возможный метаболический эффект, оказываемый НУП, даже на фоне увеличения их уровня [19, 20].

До сих пор не установлено, являются ли повышенные уровни НУП индикаторами физиологических расстройств, или у человека может быть генетическая предрасположенность к более интенсивному высвобождению НУП и действительно более эффективно компенсировать гемодинамический стресс.

В исследовании B. Geelhoed с соавт. [1] у пациентов из когорты FINRISK [21] с помощью метода менделевской рандомизации оценена взаимосвязь между уровнями НУП как при риске развития СН, так и при ФП. В результате были установлены надежные ассоциации между изменчивостью *NPPA/NPPB* и уровнем циркулирующих НУП. Однако значимая связь между изменчивостью *NPPA/NPPB* и заболеваемостью СН или ФП была исключена. Аналогичные данные были получены в отношении полиморфного варианта 5068 *NPPA*, согласно которым он не связан ни с уровнем смертности от ССЗ, ни с показателем госпитализации из-за ССЗ [4].

Результаты проведенного нами исследования не свидетельствуют о наличии причинно-следственных связей между rs198389 *NPPB*, rs5068 *NPPA* и риском развития СН или ФП. Однако, основываясь на наличии связи между минорным аллелем С rs198389 *NPPB* и уровнем BNP, можно предположить, что SNPs rs198389 *NPPB* связан с концентрацией НУП у пациентов с СН и ФП.

Отсутствие связи rs198389 *NPPB* с уровнем NT-proBNP у пациентов с ФП и СН может указывать на то, что генетическая детерминированность уровней НУП у пациентов с СН и ФП ослабевает, так как вовлечение патогенетических механизмов ФП дополнительно повышает

уровень NT-proBNP [22]. Схожая клиническая картина и динамика изменения уровней НУП при СН и ФП свидетельствуют о перекрестных патофизиологических механизмах развития данных заболеваний и о наличии множества непрямых причинно-следственных связей между СН и ФП. Несмотря на значимое повышение уровней НУП как при развитии СН, так и при ФП, эта связь реализуется через дополнительные механизмы.

Таким образом, нами обнаружена существенная связь SNPs rs198389 с уровнем BNP у пациентов с СН и ФП. Учитывая тот факт, что отсутствие защитного аллеля T rs198389 *NPPB* ассоциировано с более высоким риском прогрессирования СН у пациентов с СН и ФП, можно предположить, что в прогрессировании СН важную роль играет rs198389 гена *NPPB* или его связь с отдельными фенотипами синдрома СН [9].

Выводы

1. Впервые установлено, что в селективной выборке белорусской популяции распределение частот генотипов и аллелей SNPs rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* аналогично таковому в западноевропейской и американской популяциях.

2. Распределение частот генотипов и аллелей SNPs rs198389 *NPPB* и rs5068 *NPPA* у пациентов с СН с ФВ ЛЖ < 50 % сопоставимо с аналогичным показателем у лиц, не страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

3. У пациентов с СН и ФВ ЛЖ < 50 % и постоянной или персистирующей формой ФП минорный аллель C rs198389 гена *NPPB* ассоциирован с более высоким уровнем BNP, но не связан с уровнем NT-proBNP.

4. У пациентов с СН с ФВ ЛЖ < 50 % и постоянной или персистирующей формой ФП уровень ANP не ассоциирован с полиморфным вариантом rs5068 гена *NPPA*.

5. Присутствие в генотипе аллеля C полиморфного маркера rs198389 *NPPB* ассоциировано с более высоким риском госпитализации пациентов с СН и ФП из-за прогрессирования СН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Assessment of causality of natriuretic peptides and atrial fibrillation and heart failure: a Mendelian randomization study in the FINRISK cohort / B. Geelhoed [et al.] // Europace. – 2020. – Vol. 22, N 10. – P. 1463–1469. https://doi.org/10.1093/europace/euaa158

2. Prognostic Value of N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Levels in Heart Failure Patients with and Without Atrial Fibrillation / S. L. Kristensen [et al.] // Circ.: Heart Fail. – 2017. – Vol. 10, N 10. – P. e004409. https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004409

3. Impact of Atrial Fibrillation on Natriuretic Peptides: An Invasive Atrial Hemodynamic Study / M. Sramko [et al.] // JACC: Clin. Electrophysiol. – 2018. – Vol. 4, N 1. – P. 153–154. https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.05.008

4. A favorable cardiometabolic profile is associated with the G allele of the genetic variant rs5068 in African Americans: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) / V. Cannone [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, N 12. – P. e0189858. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189858

5. Association of genetic variation in the natriuretic peptide system with cardiovascular outcomes / K. L. Ellis [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2011. – Vol. 50, N 4. – P. 695–701. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.01.010

6. Common genetic variants of the natriuretic peptide gene locus are not associated with heart failure risk in participants in the EPIC-Norfolk study / R. Pfister [et al.] // Eur. J. Heart Fail. – 2013. – Vol. 15, N 6. – P. 624–627. https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft007

7. An NPPB promoter polymorphism associated with elevated N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and lower blood pressure, hypertension, and mortality / S. B. Seidelmann [et al.] // J. Am. Heart Assoc. – 2017. – Vol. 6, N 4. – P. e005257. https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005257

8. The atrial natriuretic peptide genetic variant rs5068 is associated with a favorable cardiometabolic phenotype in a Mediterranean population / V. Cannone [et al.] // Diabetes Care. – 2013. – Vol. 36, N 9. – P. 2850–2856. https://doi.org/10.2337/dc12-2337

9. A genetic variant of the atrial natriuretic peptide gene is associated with cardiometabolic protection in the general community / V. Cannone [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2011. – Vol. 58, N 6. – P. 629–636. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.05.011

10. ASA status, NPPA/NPPB haplotype and coronary artery disease have an impact on BNP/NT-proBNP plasma levels / M. Hahn [et al.] // Cells. – 2022. – Vol. 11, N 5. – Art. 766. https://doi.org/10.3390/cells11050766

11. Genetic variation in the B-type natiuretic peptide pathway affects BNP levels / D. E. Lanfear [et al.] // Cardiovasc. Drugs Ther. – 2007. – Vol. 21, N 1. – P. 55–62. https://doi.org/10.1007/s10557-007-6007-5

12. Linkage disequilibrium analyses of natriuretic peptide precursor B locus reveal risk haplotype conferring high plasma BNP levels / Y. Takeishi [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 362, N 2. – P. 480–484. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.028

13. Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations / A. Meirhaeghe [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2007. Vol. 16, N 11. – P. 1343–1350. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm084

14. Zakirpva, G. A. Association of rs198389 NPPB gene polymorphism with chronic heart failure / G. A. Zakirpva, U. K. Kamilova // Am. J. Medicine Med. Sci. – 2021. Vol. 11, N 8. – P. 553–556. https://doi.org/10.5923/j.ajmms.20211108.01

15. STOP-HF Trial: Higher endogenous BNP and cardiovascular protection in subjects at risk for heart failure / V. Cannone [et al.] // JACC: Basic Transl. Sci. – 2021. – Vol. 6, N 6. – P. 497–504. https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.05.001

16. Unexpectedly low natriuretic peptide levels in patients with heart failure / K. N. Bachmann [et al.] // JACC: Heart Fail. – 2021. – Vol. 9, N 3. – P. 192–200. https://doi.org/10.1016/j.jchf.2020.10.008

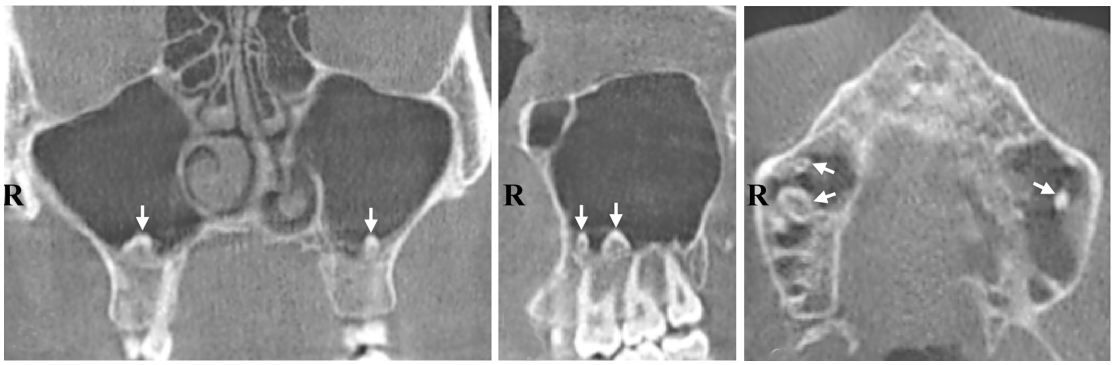
17. In-hospital mortality is associated with high NT-proBNP level / M. Benmachiche [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, N 11. – P. e0207118. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207118

18. Prognostic value of brain natriuretic peptide vs history of heart failure hospitalization in a large real-world population / M. Z. Zile [et al.] // Clin. Cardiol. – 2020. – Vol. 43, N 12. – P. 1501–1510. https://doi.org/10.1002/clc.23468

19. Chen, H. H. Heart failure: a state of brain natriuretic peptide deficiency or resistance or both! / H. H. Chen // J. Am. Coll. Cardiol. – 2007. – Vol. 49, N 10. – P. 1089–1091. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.013

20. Quantitative mass spectral evidence for the absence of circulating brain natriuretic peptide (BNP-32) in severe human heart failure / A. M. Hawkridge

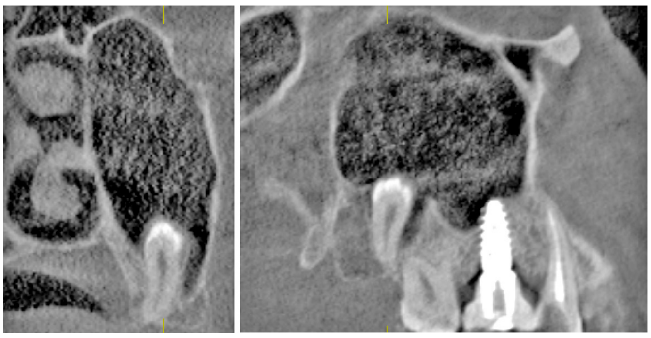
Multiple supernumerary teeth inside maxillary sinus. The case presents 45-year-old male with multiple supernumerary teeth (paramolars) on the level of permanent molars inside maxillary sinus and its floor (Fig. 3). Cortical plates were not visualized around the crowns of ectopic teeth. Spatial resolution of CBCT images does not allow us to state with certainty that eruption of supernumerary teeth into the sinus cavity has occurred. Both maxillary sinuses did not show any radiographic signs of sinusitis.



a *b* *c*

Fig. 3. CBCT, coronal (*a*), sagittal (*b*), and axial (*c*) images showing multiple (three) supernumerary inverted paramolars (arrows) erupted into the maxillary sinus

Ectopic inverted tooth 2.8 in the maxillary sinus. The case presents 29-year-old female examined prior to dental prosthetic treatment. CBCT revealed ectopic inverted fully formed single rooted left third molar (Fig. 4). Tooth crown and cervical third of the root were observed in the maxillary sinus. The tooth was totally surrounded by its bony crypt. Left maxillary sinus did not show any radiographic signs of sinusitis.



a *b*

Fig. 4. CBCT, coronal (*a*), and sagittal (*b*) images showing ectopic inverted tooth 2.8

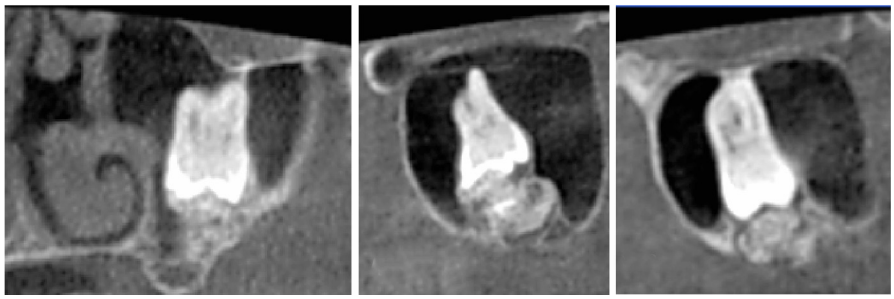
Mesiodens in the maxillary sinus. The case presents 26-year-old female examined for pathology of the temporomandibular joint. CBCT showed the presence of mesiodens in the maxillary sinus. Fully formed microdent tooth (mesiodens) having root dilaceration surrounded by its bony crypt was located horizontally inside bone at the base of alveolar process on the level of teeth 2.1–2.3, the crown of tooth was displaced into palatal recess of maxillary sinus (Fig. 5). Radiographic signs of sinusitis were not present in both sinuses.

Complex odontoma associated with impacted tooth 2.6. 30-year-old male examined before prosthetic rehabilitation of the edentulous posterior maxilla. CBCT revealed a well-demarcated lesion inside the left maxillary sinus measuring 1.53 cm in greatest dimension, which included fragments of tooth tissues and radiolucent areas (Fig. 6). The impacted inverted first molar was intimately associated with the lesion and surrounded by a thin cortical plate. The apices of the fused molar roots reached the upper wall of the sinus at the level of the infraorbital canal. Drainage of the left maxillary sinus was not disturbed; signs of sinusitis were not present.



a *b* *c*

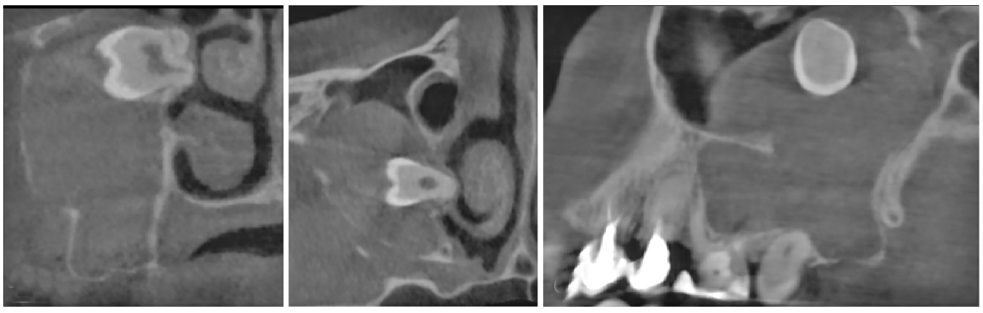
Fig. 5. CBCT, axial (*a*), coronal (*b*), and sagittal (*c*) images showing mesiodens in the maxillary sinus



a *b* *c*

Fig. 6. CBCT, coronal (*a*), and sagittal (*b*, *c*) images showing complex odontoma associated with impacted inverted tooth 2.6

Dentigerous cyst associated with ectopic maxillary third molar. The case presents 46-year-old asymptomatic male examined prior to dental prosthetic treatment. CBCT revealed a well-demarcated radiopaque lesion occupying right maxillary sinus and displacing third maxillary molar to the level of fontanelle (Fig. 7). The lesion was associated with the dental crown of the impacted tooth and attached at the cementoenamel junction. The tooth roots were curved and prolapted into the nasal cavity by 4.4 mm (under the nasal mucosa). According to the imaging features, the diagnostic hypothesis was a dentigerous cyst. The cyst had caused destruction of the alveolar bone at the right maxillary molar region. The right ostiomeatal unit was not obstructed.



a *b* *c*

Fig. 7. CBCT, coronal (*a*), axial (*b*), and sagittal (*c*) images showing soft-tissue mass occupying almost the entire right maxilla R y sinus and involving ectopic third maxillary molar

Discussion. The presence of an ectopic tooth in the non-dentate area like maxillary sinus is very rare [4]. According to Lamb et al. [8], 35 of such cases were reported in English language literature from 1927 to the first decade of the 2000s. Ectopic teeth may or may not be associated with clinical symptoms. Ectopic teeth in the maxillary sinus can cause local sinonasal symptoms [9]. Presented article describes CBCT data of seven asymptomatic patients with ectopic teeth in the maxillary sinus.

A rarity case (#3 of the article) was the presence of multiple supernumerary teeth partially erupted inside maxillary sinus bilaterally without other symptoms of syndromes associated with multiple ectopic

teeth. Search on PubMed utilizing keywords such as "ectopic," "teeth," "maxillary sinus", "supernumerary", "multiple" did not show any similar cases.

Some reports suggest an association of ectopic teeth with dentigerous cysts [10]. Dentigerous cysts are the most frequent type of developmental odontogenic cysts associated with unerupted teeth. They develop due to the accumulation of fluid between the crown of an impacted tooth and the reduced enamel epithelium or between the layers of enamel epithelium. Thus, the cyst encloses the crown and is attaches to the tooth at the cementoenamel junction [11, 12]. The incidence of dentigerous cyst formation around unerupted teeth is about 1.44 % [13]. Dentigerous cyst associated with an ectopic tooth in the maxillary sinus is very rare [1]. Case #7 of the article presents a dentigerous cyst associated with third maxillary molar displaced to the level of the maxillary sinus fontanelle. The sinus cavity was subtotally occupied with lesion but the patient had no any sinonasal complaints.

Odontoma is a benign calcified odontogenic tumor composed of odontogenic epithelium and odontogenic mesenchyme and constitute about 22 % of all odontogenic tumors of the jaws [14]. Complex odontoma is a malformation in which all tooth tissues are presented, but located in a more or less random order; whereas a compound odontoma is a malformation in which all tooth tissues form a set of tooth-like structures [15]. Odontomas are usually asymptomatic and frequently revealed incidentally during x-ray examinations [6]. Case # 6 presents a complex odontoma, which made the process of eruption of the permanent upper molar impossible, and the continued growth of the tumor caused its displacement inside maxillary sinus.

Those parts of the ectopic teeth, which were located inside the maxillary sinus from cases #1–5, were surrounded by their bony crypts (except crowns of supernumerary paramolars from case #3). This fact indicates that ectopic teeth did not erupt into the maxillary sinus.

Conclusion. The article presents seven cases of ectopic teeth that were diagnosed within maxillary sinus as an accidental radiological finding, since they were not accompanied by maxillary sinusitis symptoms. CBCT is crucial for determining the exact location and morphology of such teeth, as well as their relationship with the surrounding anatomical structures. Surgical removal of such teeth is preferred due to the tendency of impacted teeth to form odontogenic cysts or tumors.

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

References

1. Abd El-Fattah A. M., Khafagy Y. W., El-Sisi H., Elkahwagi M., Ebada H. A. Ectopic maxillary sinus third molar with dentigerous cyst in 11 patients: Tailored endoscopic-assisted approaches for a successful outcome. *Clinical Otolaryngology*, 2021, vol. 46, no. 5, pp. 1095–1099. https://doi.org/10.1111/coa.13771

2. Elsayed S. A., Althagafi N., Bahabri R., Alshanqiti M. M., Alrehaili A. M., Alahmadi A. S. Retrospective radiographic survey of unconventional ectopic impacted teeth in Al-Madinah Al-Munawwarah, Saudi Arabia. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2020, vol. 8, no. D, pp. 203–208. https://doi.org/10.3889/oamjms.2020.4533

3. Kheir M. K., Sheikhi M. Ectopic third molar in maxillary sinus: an asymptomatic accidental finding. *Egyptian Journal of Otolaryngology*, 2019, vol. 35, pp. 219–221. https://doi.org/10.4103/ejo.ejo_80_18

4. Ramanojam S., Halli R., Hebbale M., Bhardwaj S. Ectopic tooth in maxillary sinus: Case series. *Annals of Maxillofacial Surgery*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 89–92. https://doi.org/10.4103/2231-0746.110075

5. AlKhudair B., AlKhatib A., AlAzzeh G., AlMomen A. Bilateral dentigerous cysts and ectopic teeth in the maxillary sinuses: A case report and literature review. *International Journal of Surgery Case Reports*, 2019, vol. 55, pp. 117–120. https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2019.01.012

6. Torul D., Keskin M., Gun S., Odabasi D. Complex-compound odontoma: A rare clinical presentation. *Odovtos International Journal of Dental Sciences*, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 23–28. https://doi.org/10.15517/ijds.v0i0.33920

7. Ćabov T., Fuchs P. N., Zulijani A., Ćabov Ercegović L., Marelić S. Odontomas: pediatric case report and review of the literature. *Acta Clinica Croatica*, 2021, vol. 60, no. 1, pp. 146–152. https://doi.org/10.20471/acc.2021.60.01.22

8. Lamb J. F., Husein O. F., Spiess A. C. Ectopic molar in the maxillary sinus precipitating a mucocele: a case report and literature review. *Ear, Nose and Throat Journal*, 2009, vol. 88, no. 8, pp. E6–E11.

9. Almomen A., Alkhudair B., Alkhatib A., Alazzah G., Ali Z., Al Yaeesh I., AlOmairin A., Alshuaibi A., AlBahr A. Ectopic maxillary tooth as a cause of recurrent maxillary sinusitis: a case report and review of the literature. *Journal of Surgical Case Reports*, 2020, no. 9, art. rjaa334. https://doi.org/10.1093/jscr/rjaa334

10. Garde J. B., Kulkarni A. U., Dadhe D. P. Ectopic tooth in the orbital floor: an unusual case of dentigerous cyst. *BMJ Case Reports*, 2012, vol. 2012, art. bcr1120115266. https://doi.org/10.1136/bcr.11.2011.5266

11. Barresi A., Oteri G., Alibrandi A., Peditto M., Rapisarda S., Cardia R., Marcianò A., Lentini M. A Comparative Statistical Analysis on the Incidence of Developmental, Inflammatory and Neoplastic Odontogenic Cysts – A Single Center Retrospective Analysis from Italy. *Oral*, 2021, vol. 1, no. 1, pp. 15–22. https://doi.org/10.3390/oral1010003

12. Woods M., Reichart P. A. Surgical Management of Nonmalignant Lesions of the Mouth. *Maxillofacial Surgery. 3rd ed.* Churchill Livingstone, 2017.

13. Khandeparker R. V., Khandeparker P. V., Virginkar A., Savant K. Bilateral maxillary dentigerous cysts in a non-syndromic child: A rare presentation and review of the literature. *Case Reports in Dentistry*, 2018, vol. 2018, art. 7583082. https://doi.org/10.1155/2018/7583082

14. Gargi V., Ravi Prakash S. M., Nagaraju K., Gupta S. Varied radiographic appearences of complex odontoma-case series and clinical-radiographic review. *Journal of Oral Diagnosis*, 2018, vol. 3, art. e20180033.

15. Takeda Y., Tomich C. E. *Ameloblastic fibroodontoma. World Health Organization Classification of Tumors (WHO).* Lyon, IARC Press, 2005.

Information about the authors

Yuliya M. Melnichenko – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-8742-6973. E-mail: mjm1980@yandex.ru

Sergey L. Kabak – Ph. D. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-7173-1818. E-mail: kabakmorph@gmail.com

Nina A. Savrasova – Ph. D. (Med.), Associate Professor, radiologist. Medical center "LODE" (58A, Nezavisimosti Ave., Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-1297-0226. E-mail: ninasavrassova@tut.by

Ruslan S. Mekhtiev – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhynski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-0146-6841. E-mail: mekhtiev.r.s@gmail.com

Информация об авторах

Мельниченко Юлия Михайловна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-8742-6973. E-mail: mjm1980@yandex.ru mjm1980@yandex.by

Кабак Сергей Львович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-7173-1818. E-mail: kabakmorph@gmail.com

Саврасова Нина Александровна – канд. мед. наук, доцент, врач-рентгенолог. Медицинский центр «ЛОДЭ» (пр. Независимости, 58А, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-1297-0226. E-mail: ninasavrassova@tut.by

Мехтиев Руслан Салманович – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-0146-6841. E-mail: mekhtiev.r.s@gmail.com

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616-006.6:577.121
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-112-125

Поступила в редакцию 10.03.2022
Received 10.03.2022

А. Д. Таганович[1], Н. Н. Ковганко[1], В. И. Прохорова[2], А. В. Колб[1], О. В. Готько[2]

[1]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[2]Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь

ЗНАЧИМОСТЬ ФРАГМЕНТА ЦИТОКЕРАТИНА-19 И РЕЦЕПТОРОВ CXCR1, CXCR2 В КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С III СТАДИЕЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Аннотация. Немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) в III стадии представляет собой неоднородную группу опухолей. Прогноз для пациентов с III стадией НМКРЛ остается плохим, а 5-летняя выживаемость составляет не более 20 %. Поэтому актуальной является необходимость разработки прогнозных показателей, которые позволили бы предсказывать прогрессирование опухолевого процесса, чтобы оптимизировать стратегию и тактику лечения пациентов.

Целью исследования являлось выяснение и обоснование возможности использования лабораторных показателей, характеризующих уровень белков крови – участников канцерогенеза, в прогнозе прогрессирования НМКРЛ у пациентов с III стадией этого заболевания.

У 1187 пациентов с впервые диагностированным НМКРЛ III стадии проанализирована длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. Средний возраст пациентов составил 63 ± 23 года. У 89 пациентов (возраст 58 ± 23,5 года) измерялись концентрации CYFRA 21-1, SCC, TPA электрохемилюминесцентным методом; M2 пируваткиназы, хемокинов CXCL5, CXCL8 – иммуноферментным методом; рецепторов CXCR1 и CXCR2 – методом проточной цитометрии.

С помощью многофакторной модели пропорциональных рисков Кокса обнаружена тесная связь уровня CYFRA 21-1 и доли лимфоцитов, содержащих CXCR1, с длительностью безрецидивного периода у пациентов с III стадией НМКРЛ после проведенного лечения. По итогам одногодичного наблюдения и графического анализа Каплана–Майера определены группы низкого (T1N2M0, T3N1M0, T2N2M0, T4N0M0, T3N2M0) и высокого (T1N3M0, T2N3M0, T3N3M0, T4N1M0, T4N2M0, T4N3M0) риска прогрессирования опухоли. У пациентов с высоким риском по сравнению с пациентами с низким риском больше был уровень CYFRA 21-1, относительное содержание рецептора CXCR1 в лимфоцитах и рецептора CXCR2 в моноцитах ($p < 0,05$). С использованием этих показателей по результатам логистического регрессионного анализа построено уравнение, с помощью которого можно прогнозировать риск рецидива опухоли. Пороговое значение уравнения – 0,519. Чувствительность модели построения прогноза – 80,9 %, специфичность – 83,3 %, прогностическая ценность положительного результата – 84,4 %, отрицательного результата – 79,6 %.

Итоги проведенного исследования дают основание рекомендовать измерение у пациентов с III стадией НМКРЛ комплекса лабораторных показателей крови, включающего уровень CYFRA 21-1 и параметры рецепторов CXCR1 и CXCR2, с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, III стадия, прогрессирование, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, выживаемость до прогрессирования

Для цитирования: Значимость фрагмента цитокератина-19 и рецепторов CXCR1, CXCR2 в крови для прогнозирования безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией немелкоклеточного рака легкого / А. Д. Таганович [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 112–125. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-112-125

Anatoli D. Tahanovich[1], Nikolai N. Kauhanka[1], Violetta I. Prokhorova[2], Alexander V. Kolb[1], Oksana V. Got'ko[2]

[1]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[2]N. N. Alexandrov National Cancer Centre, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus

SIGNIFICANCE OF THE CYTOKERATIN-19 FRAGMENT AND CXCR1, CXCR2 RECEPTORS IN THE BLOOD FOR PREDICTION OF THE RELAPSE-FREE SURVIVAL OF PATIENTS WITH STAGE III NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Abstract. Stage III non-small cell lung cancer (NSCLC) is a heterogeneous group of tumors. The prognosis for patients with stage III NSCLC remains poor, and the 5-year survival rate is not more than 20 %. Therefore, an actual problem is to develop prognostic indicators that would allow predicting the progression of the tumor process in patients in order to correctly build strategy and tactics for their treatment.

The objective of the study was to clarify and substantiate the possibility of using laboratory parameters characterizing the level of blood proteins – participants in carcinogenesis in predicting the NSCLC progression in patients with stage III disease.

In 1187 patients who were first diagnosed with stage III NSCLC, the duration of the relapse-free period after treatment was analyzed using the observation results for one year. The mean age of patients was 63 ± 23 years. In 89 patients (58 ± 23.5 years), the concentration of CYFRA 21-1, SCC, TPA were determined by electrochemiluminescent method; pyruvate kinase M2, CXCL5, CXCL8 chemokines – by enzyme immunoassay; CXCR1 and CXCR2 receptors– by flow cytometry.

A proportional hazards model was used to identify potentially informative indicators for predicting the duration of the relapse-free period in patients with stage III NSCLC: the levels of lymphocytes containing CXCR1 and CYFRA 21-1. Based on the one-year observation results and the graphical analysis of Kaplan-Meier, groups of low (T1N2M0, T3N1M0, T2N2M0, T4N0M0, T3N2M0) and high (T1N3M0, T2N3M0, T3N3M0, T4N1M0, T4N2M0, T4N3M0) risk of tumor progression were identified. High-risk patients had a higher level of CYFRA 21-1, a relative content of the receptor CXCR1 in lymphocytes, and a relative content of the receptor CXCR2 in monocytes compared to low-risk patients ($p < 0.05$). With their participation, based on the results of logistic regression analysis, an equation was constructed, the calculation of which makes it possible to predict the risk of tumor recurrence. The threshold value of the equation is 0.519. The sensitivity of the prediction model was 80.9 %, the specificity was 83.3 %, and the prediction value of a positive result was 84.4 % and that of a negative result – 79.6 %.

The study results give grounds to recommend a set of laboratory parameters in the blood of stage III NSCLC patients, including the CYFRA 21-1 level and the receptors CXCR1 and CXCR2, in order to assess their tumor progression risk.

Keywords: non-small cell lung cancer, stage III, progression, CYFRA 21-1, CXCR1, CXCR2, relapse-free survival

For citation: Tahanovich A. D., Kauhanka N. N., Prokhorova V. I., Kolb A. V., Got'ko O. V. Significance of the cytokeratin-19 fragment and CXCR1, CXCR2 receptors in the blood for prediction of the relapse-free survival of patients with stage III non-small cell lung cancer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 112–125 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-112-125

Введение. Рак легкого является ведущей причиной смертности вследствие злокачественных новообразований [1]. В структуре заболеваемости раком легкого немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ) составляет 80 %. При этом около 30 % всех случаев НМКРЛ приходится на пациентов с III стадией [2, 3]. НМКРЛ в III стадии – это неоднородная группа опухолей, различающаяся как своим размером (T1–T4) и наличием инвазии в окружающие структуры средостения, так и характером поражения медиастинальных лимфоузлов (N0–N3). При III стадии НМКРЛ отсутствуют отдаленные метастазы (M0). Практически у всех пациентов с III стадией заболевания, за исключением стадии IIIC (N3), проводится хирургическое лечение. Другие комбинации размера опухоли и метастазирования включают помимо оперативного лечения проведение неоадъювантной и адъювантной химиотерапии, причем последняя может сочетаться с радиотерапией [4].

Разные схемы лечения продиктованы необходимостью их быть адекватными состоянию пациента и направлены на предотвращение прогрессирования заболевания. Несмотря на это, прогноз для пациентов с III стадией НМКРЛ остается плохим. Медиана выживаемости составляет 20 мес., а 5-летняя выживаемость – не более 20 % [5, 6].

Одним из подходов к оптимизации и, соответственно, к повышению эффективности проводимого лечения является возможность различать среди пациентов с III стадией лиц с высоким или низким риском прогрессирования. Попытке создать такие предикторы посвящен ряд исследований. Результаты измерения поглощения тканью опухоли ^{18}F-фтордезоксиглюкозы с помощью позитронно-эмиссионной томографии, оценки объема опухоли и ее чувствительности (на основании клинической симптоматики) к химио- и радиотерапии [7–10] не принесли желаемого результата, как полагают, из-за большой гетерогенности опухолей при III стадии НМКРЛ. Ведущим критерием выживаемости или вероятности прогрессирования заболевания у пациента остается стадия.

В процессе трансформации многие клетки эпителиального или мезенхимального происхождения начинают экспрессировать рецепторы хемокинов, и, таким образом, используют хемокины для миграции и выживания в сайтах, удаленных от первичной опухоли. В частности, хемокин CXCL8 оказывает свое действие посредством передачи сигналов через два G-протеиновых рецептора – CXCR1 и CXCR2. Активация сигнального пути посредством CXCL8-CXCR1/2 усиливает прогрессирование опухоли, так как способствует пролиферации, ангиогенезу, миграции, инвазии, выживанию клеток и вовлечению их в органоспецифическое метастазирование, в том числе при раке легкого [11, 12].

Еще одним хемокином, связывающимся с рецептором CXCR2, является CXCL5. Он служит аттрактантом для гранулоцитов. Установлено, что ось CXCL5/CXCR2 важна для развития многих раковых заболеваний человека. Концентрация белка CXCL5 в сыворотке крови была значительно увеличена при НМКРЛ по сравнению с таковой у здоровых добровольцев. Экспрессия CXCL5 коррелировала с размером опухоли и стадией НМКРЛ, метастазами в лимфоузлы и ухудшением выживаемости пациентов [13].

Результаты ранее проведенных нами исследований позволили продемонстрировать изменение уровня этих белков в крови пациентов с НМКРЛ. Установлена их связь с дескрипторами опухоли, рассчитана диагностическая эффективность их определения при этом заболевании, которая в ряде случаев превысила таковую для классических маркеров [14].

Целью исследования являлось определение возможности использования уровня биомаркеров – участников канцерогенеза в прогнозе прогрессирования немелкоклеточного рака легкого у пациентов с III стадией этого заболевания.

Материалы и методы исследования. Для обоснования групп риска прогрессирования опухоли у пациентов с III стадией НМКРЛ вначале было предпринято ретроспективное исследование, в котором использовалась информация из базы данных Белорусского канцер-регистра. У 1187 пациентов (табл. 1), у которых в период с 01.01.2015 по 31.12.2019 г. впервые был диагностирован НМКРЛ III стадии, проанализирована длительность безрецидивного периода после проведенного лечения по результатам наблюдения в течение одного года. Средний возраст пациентов составил 63 ± 23 года.

Т а б л и ц а 1. **Распределение пациентов с Ш стадией НМКРЛ в соответствии с параметрами и степенью дифференцировки опухоли (по данным ретроспективного исследования)**

T a b l e 1. **Distribution of stage III NSCLC patients according to the parameters and the tumor differentiation degree (according to a retrospective study)**

TNM	Кол-во пациентов			Степень дифференцировки (Grade)		
	Всего	Мужчины	Женщины	1	2	3
T1N2M0	91	75	16	30	37	24
T2N2M0	135	112	23	51	47	37
T3N1M0	131	86	45	47	61	23
T4N0M0	93	68	25	35	34	24
T4N1M0	99	64	35	41	37	21
T1N3M0	90	59	31	32	36	22
T2N3M0	87	61	26	31	32	24
T3N2M0	157	111	46	62	67	28
T4N2M0	123	91	32	42	48	33
T3N3M0	91	68	23	31	35	25
T4N3M0	90	68	22	33	31	26

Исследование уровня специфических маркеров, хемокинов и их рецепторов проводили у 89 пациентов (исследуемая группа, табл. 2), поступивших в стационар ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» в период с 01.01.2020 по 31.12.2021 г., у которых впервые диагностирован НМКРЛ III стадии. Средний возраст пациентов составил 58 ± 23,5 года.

Все испытуемые дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Проведение исследования было одобрено решением Комитета по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Забор крови из локтевой вены осуществляли натощак в вакутайнер с ЭДТА-К2. Концентрации антигена CYFRA 21-1 (фрагмента цитокератина-19), биомаркера плоскоклеточного рака SCC (подфракция ингибитора сериновой протеазы ТА-4) и биомаркера TPA (тканевого полипептидного антигена) в сыворотке крови определяли на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Rosche Diagnostics, GmbH, Германия), использующем принцип электрохемилюминесценции; концентрации хемокинов CXCL5, CXCL8, изофермента пируваткиназы TuM2 PK и гиалуроновой кислоты

Т а б л и ц а 2. **Распределение пациентов исследуемой группы в соответствии с параметрами и степенью дифференцировки опухоли**

T a b l e 2. **Distribution of patients in the study group according to the parameters and the tumor differentiation degree**

TNM	Кол-во пациентов			Степень дифференцировки (Grade)		
	Всего	Мужчины	Женщины	1	2	3
T1N2M0	7	5	2	3	3	1
T2N2M0	9	6	3	3	5	1
T3N1M0	10	7	3	2	4	4
T4N0M0	8	6	2	2	4	2
T4N1M0	7	4	3	2	3	2
T1N3M0	8	4	4	4	3	1
T2N3M0	10	7	3	3	4	3
T3N2M0	8	5	3	2	5	1
T4N2M0	7	5	2	2	3	2
T3N3M0	8	5	3	2	4	2
T4N3M0	7	5	2	3	3	1

в сыворотке крови пациентов с НМКРЛ – с помощью ИФА-наборов FineTest (КНР) на автоматическом ИФА-анализаторе Brio (Seac, Италия), оптическую плотность ИФА-наборов – при длине волны 450 нм и референсной длине волны 620 нм на планшетном фотометре Sirio (Seac, Италия).

Концентрацию рецепторов CXCR1 и CXCR2 в клетках лейкоцитарного ряда и плотность их расположения в мембране клетки определяли, используя проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter, США). В пробирку помещали 100 мкл крови, стабилизированной ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта, и смесь растворов соответствующих антител (по 5 мкл), содержащих флуоресцентные метки: CD181(CXCR1)-PE-Cy5 (BioLegend, США), CD182(CXCR2)-PE (BioLegend, США) и CD45-Pacific Orange (Exbio, Чехия). Через 15 мин инкубации в темноте с антителами, содержащими флуоресцентную метку, к смеси добавляли 1 мл лизирующего раствора VersaLyse (Beckman Coulter, Франция). Фиксацию антител на поверхности клеток проводили с помощью фиксирующего раствора IQTest 3 (Beckman Coulter, Франция).

Степень влияния исходных факторов на выживаемость оценивали с помощью модели пропорциональных рисков Кокса. Для выяснения зависимости длительности безрецидивного периода от времени наблюдения строили графики Каплана–Майера. Для сравнения групп с различным риском прогрессирования НМКРЛ использовали Log-Rank тест и χ^2 (хи-квадрат).

Построение диагностической модели осуществляли с помощью метода бинарной логистической регрессии. Использовали метод пошагового включения предикторов, который ранжирует признаки в соответствии с их вкладом в модель. Относительный вклад отдельных предикторов выражали величиной стандартизованного коэффициента регрессии. Качество приближения регрессионной модели оценивали при помощи функции правдоподобия, мерой которой служит отрицательное удвоенное значение логарифма этой функции (–2LL). Согласованность полученной модели (регрессионного уравнения) проверяли, используя тест Хосмера–Лемешева.

Интегральную диагностическую информативность лабораторных тестов оценивали с помощью метода построения характеристических ROC-кривых с последующим вычислением площади под ROC-кривой (AUC). О диагностической ценности анализируемых показателей судили на основании расчета чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного и отрицательного результатов и диагностической эффективности теста. Для этого использовали расчетные значения истинно положительных, истинно отрицательных, ложноположительных и ложноотрицательных результатов диагностического теста. Расчет производили по общепринятым формулам. Пороговое значение определяли как величину оптимального сочетания чувствительности и специфичности теста при построении кривых зависимости чувствительности от вероятности ложноположительных результатов.

При всех видах статистического анализа критическое значение уровня значимости принимали равным 5 %.

Результаты исследования. В исследование были вовлечены белки крови – участники воспалительного ответа на развивающуюся опухоль в легком. Вначале выясняли значимость их уровня в плазме и клетках крови для длительности безрецидивного периода у пациентов с III стадией НМКРЛ после проведенного лечения. Для этого использовали модель пропорциональных рисков Кокса. Результаты однофакторного анализа демонстрируют значимость уровня четырех показателей: лимфоцитов крови, снабженных CXCR1; моноцитов крови, содержащих CXCR2; SCC и CYFRA 21-1 (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. **Прогностическая ценность показателей на основе одновариантной модели пропорциональных рисков Кокса**

T a b l e 3. **Prediction value of indicators based on the one-variant Cox proportional hazards model**

Показатель	ОР	95 % ДИ	*p*
CXCR1:			
гранулоциты:			
%	0,9915	0,8847–1,1112	0,883
MFI	1,0235	0,9986–1,0490	0,064
лимфоциты:			
%	1,0998	1,0016–1,1981	**0,007**
MFI	0,8922	0,7897–1,0032	0,327
моноциты:			
%	1,0137	0,9926–1,0249	0,315
MFI	0,9592	0,9251–1,005	0,117
CXCR2:			
гранулоциты:			
%	1,0516	0,9859–1,1217	0,126
MFI	1,0086	0,9942–1,0232	0,242
лимфоциты:			
%	1,0131	0,9697–1,0583	0,561
MFI	1,0427	0,9383–1,1586	0,437
моноциты:			
%	1,0126	1,0011–1,0242	**0,031**
MFI	0,9707	0,9500–1,0018	0,097
CXCL5, пг/мл	1,0001	0,9997–1,0004	0,677
CXCL8, пг/мл	0,9995	0,9975–1,0016	0,647
SCC, нг/мл	1,0884	1,0023–1,1819	**0,044**
TPA, пг/мл	0,9994	0,9985–1,0004	0,253
TuM2-PK, пг/мл	1,0001	1,0000–1,0002	0,125
CYFRA 21-1, нг/мл	1,0624	1,0104–1,1171	**0,018**

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 4: ОР – отношение рисков; 95 % ДИ – 95 %-ный доверительный интервал; *p* – показатель уровня статистической значимости.

Значения этих параметров были использованы в многофакторном анализе, который показывает статистическую достоверность значимости доли лимфоцитов, содержащих CXCR1, в общей популяции лимфоцитов и CYFRA 21-1 для выживаемости пациентов (табл. 4). Таким образом, использование модели Кокса позволило определить потенциально информативные показатели для прогнозирования длительности безрецидивного периода у пациентов с III стадией НМКРЛ. В дальнейшем предстояло оценить их прогностическую ценность.

Т а б л и ц а 4. **Прогностическая ценность показателей на основе многовариантной модели пропорциональных рисков Кокса**

T a b l e 4. **Prediction value of indicators based on the multivariate Cox proportional hazards model**

Показатель	ОР	95 % ДИ	*p*
CXCR1 (лимфоциты), %	1,0613	1,0033–1,1307	**0,047**
CXCR2 (моноциты), %	1,0116	0,9998–1,0221	0,061
SCC, нг/мл	1,0441	0,9812–1,0823	0,099
CYFRA 21-1, нг/мл	1,0616	1,0008–1,1261	**0,0370**

Общепринятыми критериями диагностической и прогностической ценности того или иного маркера являются пороговое значение, диагностические чувствительность, специфичность, эффективность и др. [15]. Для их определения вначале необходимо было провести ретроспективное исследование, чтобы выделить группы риска прогрессирования опухоли у пациентов с III стадией НМКРЛ. С этой целью в расчет принимались только те факторы, которые связаны с развитием опухоли и в первую очередь оказывают влияние на ее прогрессирование. Считается, что к ним относятся размер опухоли, распространенность регионарных метастазов и степень дифференцировки клеток опухоли (Grade) [12]. Мы проанализировали вышеназванные факторы, сопоставив их с результатами одногодичного наблюдения после проведенного лечения до наступления рецидива заболевания.

Результаты графического анализа Каплана–Майера демонстрируют зависимость безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией НМКРЛ от размера опухоли T (рис. 1). Как и ожидалось, длительность безрецидивной выживаемости при III стадии НМКРЛ была значительно ниже у пациентов с наибольшим размером опухоли – T4 (более 7 см) (рис. 1). Меньшему размеру (T1–T3) соответствовала более низкая способность к прогрессированию заболевания.

Безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от наличия регионарных метастазов также отличалась (рис. 1). Причем у пациентов с N0–N2 она практически одинаковая, в то время как у пациентов с метастазами в контрлатеральных лимфоузлах (N3) она была значительно ниже.

Среди пациентов с III стадией НМКРЛ различают тех, у которых имеются IIIA, IIIB и IIIC стадии. Каждый из этих подтипов включает несколько сочетаний дескрипторов, различающихся размером опухоли и степенью распространенности регионарных метастазов (табл. 5). Согласно графику Каплана–Майера, начиная с 6 мес. и до 1 года после оперативного лечения четко прослеживаются три типа прогрессирования заболевания: низкий для IIIA стадии, средний для IIIB

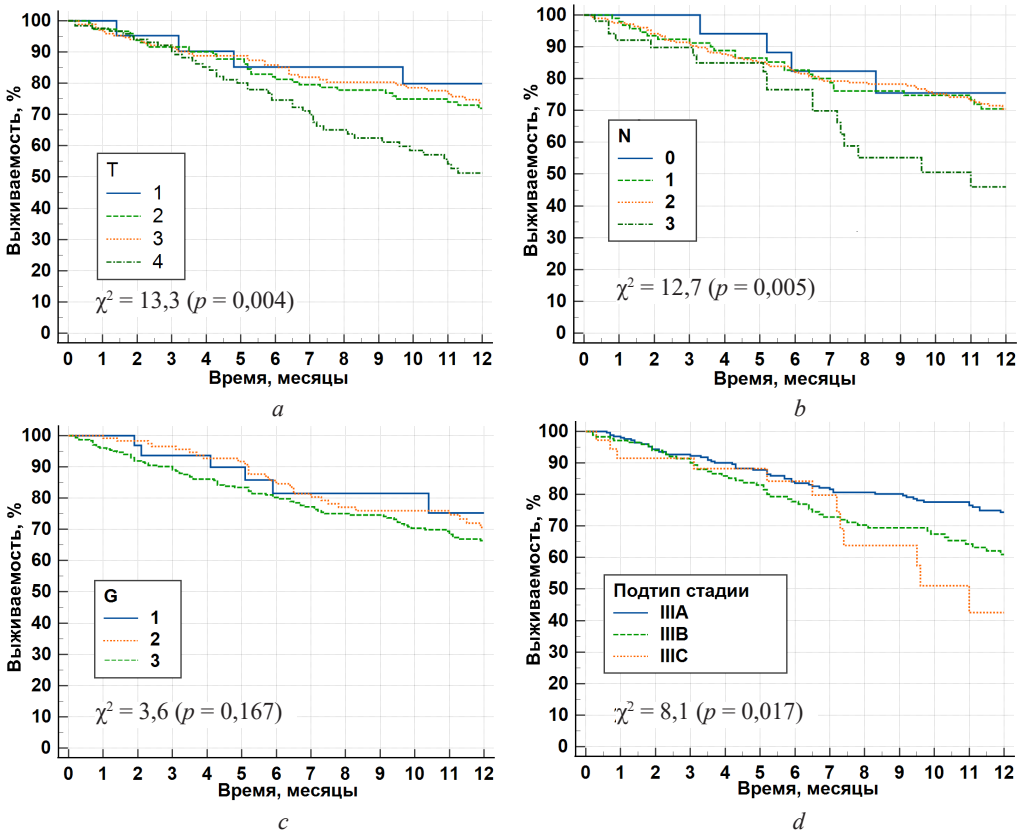


Рис. 1. Одногодичная безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от характеристик опухоли

Fig. 1. One-year relapse-free survival of stage III NSCLC patients depending on tumor characteristics

Т а б л и ц а 5. **Деление III стадии НМКРЛ на подтипы в зависимости от размера опухоли T и распространенности регионарных метастазов N**

T a b l e 5. **Division of stage III NSCLC into subtypes depending on a tumor size T and the prevalence of regional metastases N**

Подтип	Комбинация T и N
IIIA	T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T4N0M0, T4N1M0
IIIB	T1N3M0, T2N3M0, T3N2M0, T4N2M0
IIIC	T3N3M0, T4N3M0

стадии и высокий для IIIC стадии (рис. 1). Разница между ними существенна и статистически достоверна, о чем свидетельствуют результаты χ^2 при проведении Log-Rank теста (8,1; $p < 0{,}017$).

По результатам одногодичного наблюдения различной степени дифференцировки клеток опухоли (G1–G3) у пациентов с III стадией заболевания соответствовала приблизительно одинаковая безрецидивная выживаемость (см. рис. 1). Отсутствие значительного влияния степени дифференцировки клеток опухоли на развитие прогрессирования подтверждается и критерием χ^2 (3,6), значение которого, характеризуя различия в выживаемости пациентов, было статистически недостоверным ($p = 0{,}167$).

Grade характеризует степень злокачественности опухоли. Чем менее она дифференцирована, тем более злокачественна. Понятие злокачественности, как известно, включает рост опухоли и ее способность к метастазированию. Поэтому логично было предполагать отличающуюся безрецидивную выживаемость пациентов с опухолью легкого и разным Grade. Действительно, обследование 531 пациентов с НМКРЛ, проведенное в Японии, показало, что степень дифференцировки опухолевых клеток может служить в качестве критерия оценки риска рецидива заболевания после хирургического лечения, но преимущественно на I–II стадиях [16]. В проведенном нами ранее исследовании также наблюдалась разница в безрецидивной выживаемости пациентов с I–II стадиями аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого [17]. Особенностью III стадии является то обстоятельство, что заболевание уже имеет выраженный характер. Можно допустить, что на этом этапе Grade утрачивает влияние на вероятность рецидива. Поэтому мы не наблюдали существенной разницы в безрецидивной выживаемости пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от дифференцированности клеток опухоли.

У пациентов с T4N1M0 (IIIA стадия НМКРЛ) безрецидивная выживаемость после проведенного лечения меньше, чем у пациентов с другими вариантами T и N стадии IIIA (табл. 3, рис. 2). А у пациентов с T3N2M0 (IIIB стадия) рецидив заболевания развивается медленнее, чем при других TN-комбинациях этой же стадии. Согласно построенному графику Каплана–Майера (рис. 2), безрецидивная выживаемость пациентов через год после проведенного лечения делится на две группы. Одна характеризуется сравнительно высокой выживаемостью и включает пациентов с T1N2M0, T3N1M0, T2N2M0, T4N0M0, T3N2M0; другая – более коротким безрецидивным периодом и включает пациентов с T1N3M0, T2N3M0, T3N3M0, T4N1M0, T4N2M0, T4N3M0. Разница в выживаемости пациентов этих групп весьма значительна, если судить по результатам Log-Rank теста (рис. 2).

Полученные данные послужили основанием для объединения пациентов с вышеперечисленными характеристиками в группы медленного и быстрого прогрессирования заболевания после проведенного лечения. Результаты построения графика Каплана–Майера (рис. 3) в объединенных группах демонстрируют различие, которое превышает приведенные выше показатели выживаемости в зависимости только от размера опухоли T, наличия регионарных метастазов N, степени дифференцировки G или клинического подтипа стадии (A–C). Оно проявляется даже в начальный период наблюдения, но особенно отчетливо прослеживается через 3 мес., все время нарастая. Величина χ^2, характеризующая различия кривых безрецидивной выживаемости для этих групп пациентов с III стадией НМКРЛ, самая большая – 22,2 ($p < 0{,}0001$).

Безрецидивную выживаемость пациентов с III стадией НМКРЛ по результатам ретроспективного исследования сопоставили с результатами лабораторного исследования. Уровень трех

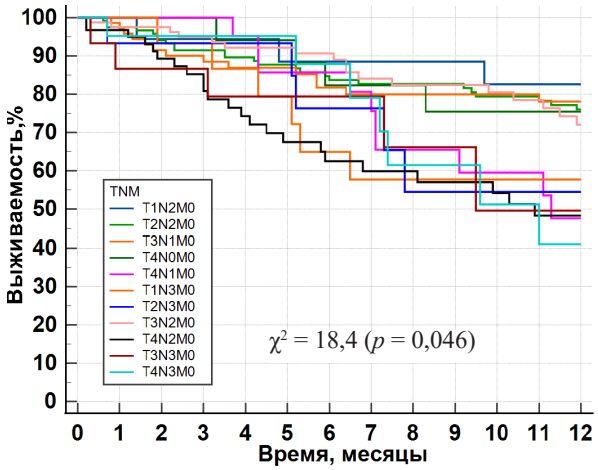


Рис. 2. Выживаемость до прогрессирования пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от размера опухоли и наличия регионарных метастазов

Fig. 2. Survival to progression of stage III NSCLC patients depending on tumor sizes and the presence of regional metastases

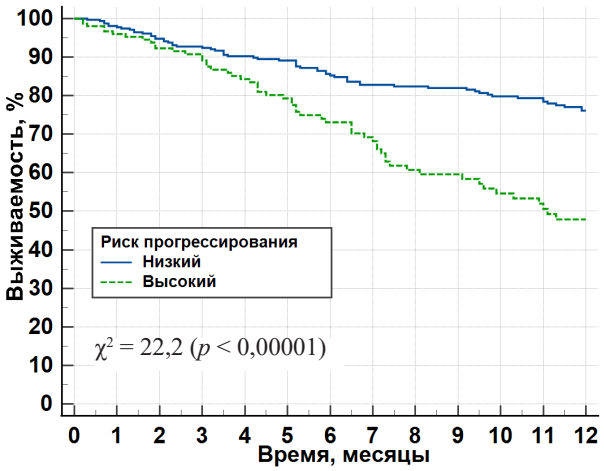


Рис. 3. Выживаемость до прогрессирования пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от групп риска, сформированных на основе размера опухоли T и наличия регионарных метастазов N

Fig. 3. Survival to progression of stage III NSCLC patients depending on the risk groups based on a tumor size T and the presence of regional metastases N

из них демонстрирует существенную разницу между группами высокого и низкого риска прогрессирования заболевания (табл. 6). Статистически достоверно более высокими у пациентов с НМКРЛ и высокой вероятностью рецидива по сравнению с пациентами, у которых вероятность рецидива низкая, были уровень CYFRA 21-1, относительное количество лимфоцитов с CXCR1 и моноцитов с CXCR2. Первые два демонстрируют, согласно одно- и многофакторной моделей Кокса, существенную связь с безрецидивной выживаемостью пациентов. Значимость для безрецидивной выживаемости в однофакторной модели Кокса показывает и третий показатель, характеризующий долю моноцитов крови, в составе которых имеется CXCR2. Поэтому все три были вовлечены в построение модели определения риска опухолевой прогрессии методом логистической регрессии. В результате составлено регрессионное уравнение для предсказания развития опухолевой прогрессии у пациентов с III стадией НМКРЛ, которое учитывает указанные параметры крови:

$$Y = \frac{\exp(-4,506 + 0,135X1 + 1,259X2 + 0,178X3)}{1 + \exp(-4,506 + 0,135X1 + 1,259X2 + 0,178X3)},$$

где X1 – концентрация антигена Cyfra 21-1 в сыворотке крови, нг/мл; X2 – относительное количество рецептора CXCR1 в лимфоцитах, %; X3 – относительное количество рецептора CXCR2 в моноцитах, %; числа перед X1–X3 – коэффициенты логистической регрессии; exp (≈ 2,718) – основание натурального логарифма; –4,506 – константа логистического уравнения.

Анализ качества созданной модели показывает, что все отобранные показатели вносят существенный вклад в логистическое уравнение. Это следует из того, что их включение в уравнение приводит к значительному снижению отрицательного удвоенного значения логарифма функции правдоподобия (Δ = 46,5, p < 0,05) и соответствует хорошему качеству предложенной модели. Об этом же свидетельствует рассчитанный критерий согласия Хосмера–Лемешева, равный 16,3 (p = 0,357). Уровень статистической значимости – p > 0,05, что подтверждает согласованность данных регрессионного уравнения при отнесении пациентов к низкому или высокому риску прогрессирования опухоли при НМКРЛ.

О надежности регрессионного уравнения, которое использует комбинацию из значений вышеназванных трех маркеров для прогнозирования риска опухолевой прогрессии, свидетельствуют и результаты ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой (рис. 4), согласно экспертной шкале

Т а б л и ц а 6. **Уровни рецепторов, лигандов, опухолевых биомаркеров и клеток крови у пациентов с низким и высоким риском прогрессирования опухоли**

T a b l e 6. **Levels of receptors, ligands, tumor biomarkers, and blood cells in patients with low and high risk of tumor progression**

Показатель	Низкий риск	Высокий риск	*p*
CXCR1:			
гранулоциты:			
%	96,15 [91,6; 97,6]	95,8 [93,1; 98,4]	0,452
MFI	33,1 [26,8; 52,0]	34,6 [30,65; 53,0]	0,648
лимфоциты:			
%	1,3 [0,7; 1,8]	3,55 [3,25; 4,4]	**0,001**
MFI	13,6 [3,4; 14,7]	13,7 [3,7; 14,8]	0,821
моноциты:			
%	2,6 [0,5; 25,4]	2,7 [0,8; 27,2]	0,898
MFI	27,9 [3,3; 35,6]	33,8 [4,8; 36,1]	0,370
CXCR2:			
гранулоциты:			
%	92,5 [68,9; 96,6]	92,5 [73,8; 95,0]	0,611
MFI	80,6 [65,8; 90,1]	83,9 [64,15; 90,8]	0,552
лимфоциты:			
%	17,3 [10,4; 24,0]	17,2 [13, 5; 23,4]	0,844
MFI	12,9 [11,7; 15,2]	13,3 [11,5; 15,0]	0,785
моноциты:			
%	1,25 [0,50; 2,80]	3,20 [2,35; 3,90]	**0,003**
MFI	64,6 [21,4; 76,1]	65,35 [18,25; 78,55]	0,935
CD44v6:			
гранулоциты:			
%	2,50 [1,18; 4,93]	2,70 [1,73; 4,78]	0,099
MFI	2,7 [2,4; 3,9]	2,6 [1,95; 7,2]	0,721
лимфоциты:			
%	0,7 [0,20; 1,40]	1,20 [0,50; 2,10]	0,063
MFI	3,1 [1,9; 5,15]	3,5 [1,9; 4,15]	0,255
моноциты:			
%	1,4 [0,2; 2,925]	1,2 [0,125; 2,85]	0,555
MFI	5,4 [3,225; 18,8]	5,3 [2,825; 10,05]	0,506
CXCL5, пг/мл	1076,6 [642,2; 1576,1]	1254,35 [753,85; 1937,35]	0,368
CXCL8, пг/мл	129,8 [80,3; 228,6]	134,82 [92,4; 230,0]	0,764
Гиалуроновая кислота, нг/мл	24,8 [18,5; 33,475]	24,4 [20,4; 30,5]	0,723
HIF-1a, пг/мл	3,10 [2,27; 3,73]	3,02 [2,22; 4,25]	0,959
SCC, нг/мл	1,91 [1,218; 3,148]	2,36 [1,41; 3,30]	0,170
TPA, пг/мл	907,70 [748,65; 1183,52]	968,04 [520,825; 1133,26]	0,748
TuM2-PK, пг/мл	1906,45 [1610,95; 2344,95]	2193,03 [1684,30; 3137,30]	0,297
CYFRA 21-1, нг/мл	3,54 [2,50; 5,70]	6,98 [5,18; 13,89]	**0,001**

AUC, соответствует «очень хорошему» качеству прогностической модели (0,847). Оптимальное пороговое значение для разделения групп низкого и высокого риска развития опухолевой прогрессии составляет 0,519 (табл. 7, рис. 4). То есть, если значение $Y > 0{,}519$, то в 84,4 % случаев у пациента действительно будет высокий риск рецидива опухоли, в то время как при значении $Y \leq 0{,}519$ у 79,6 % пациентов будет правильно составлен прогноз низкого риска прогрессирования опухоли.

Диагностическая эффективность прогноза низкого или высокого риска развития рецидива опухоли в случае использования результатов логистического уравнения значительно выросла – до 82,0 % (чувствительность – 80,9 %, специфичность – 83,3 %). Как видно, все эти показатели оказались гораздо выше, чем при использовании каждого из них в отдельности с аналогичной прогностической целью (табл. 7).

Т а б л и ц а 7. **Диагностическая значимость индивидуального и комбинированного определения уровня параметров в крови пациентов с низким и высоким риском опухолевой прогрессии после проведенного лечения**

T a b l e 7. **Diagnosis significance of individual and combined determination of the parameter level in the blood of patients with low and high risk of tumor progression after treatment**

Показатель	ПЗ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦОР	AUC	ДЭ
CYFRA 21-1, г/л ($\times 10^{-6}$)	>4,83	78,7	64,3	71,2	73,0	0,785	71,9
CXCR1 (лимфоциты), %	>2,12	74,5	71,4	74,5	71,4	0,801	73,0
CXCR2 (моноциты), %	>2,0	68,1	73,8	74,4	67,4	0,763	70,8
Комбинация (*Y*)	**>0,519**	**80,9**	**83,3**	**84,4**	**79,6**	**0,847**	**82,0**

П р и м е ч а н и е. ПЗ – пороговое значение, ДЧ – диагностическая чувствительность, ДС – диагностическая специфичность, ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата, ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата, AUC – площадь под ROC-кривой, ДЭ – диагностическая эффективность.

Работоспособность предложенной регрессионной модели на основе полученного порогового значения $Y = 0{,}519$ демонстрирует график Каплана–Майера выживаемости пациентов с III стадией НМКРЛ до прогрессирования (рис. 5). Распределение безрецидивной выживаемости на относительно высокую и низкую, по данным однолетнего наблюдения, соответствует результатам ретроспективного исследования (см. рис. 3). Выживаемость к концу первого года для пациентов с низким риском развития опухолевой прогрессии составляет 76 % (ретроспективное исследование) и 79 % при использовании отобранных параметров крови в регрессионном уравнении. Для пациентов с высоким риском опухолевой прогрессии выживаемость к концу первого года после проведенного лечения составляет 48 и 50 % соответственно. Обращает внимание еще одно обстоятельство. Отчетливая разница между графиками высокой и низкой выживаемости имеет место уже на первом месяце после проведенного лечения. В дальнейшем она увеличивается.

Обсуждение. У большинства пациентов НМКРЛ диагностируется поздно, когда заболевание выражено и имеются метастазы. Практически всем пациентам с III стадией проводится хирургическое лечение, за исключением пациентов с N3, а также тех, кому проведена адъювантная и неоадъювантная терапия. Терапевтическое лечение связано с массой побочных эффектов, поэтому оно может принести максимальную пользу только будучи целенаправленным [18]. С этой целью жизненно важно предвидеть прогрессирование заболевания во время лечения, чтобы не

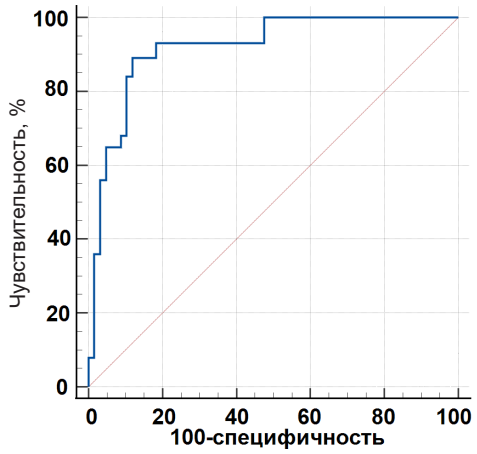


Рис. 4. ROC-кривая результатов уравнения логистической регрессии для оценки риска опухолевой прогрессии у пациентов с III стадией НМКРЛ на основании определения в крови уровня CYFRA 21-1 и рецепторов CXCR1, CXCR2

Fig. 4. ROC-curve for the results of the logistic regression equation for assessing the tumor progression risk in stage III NSCLC patients based on determining the CYFRA 21-1 blood level and the receptors CXCR1, CXCR2

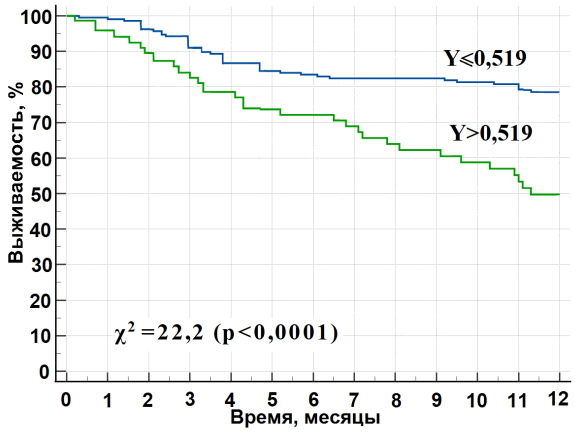


Рис. 5. Безрецидивная выживаемость пациентов с III стадией НМКРЛ в зависимости от результата регрессионного уравнения Y

Fig. 5. Relapse-free survival of patients with stage III NSCLC depending on the values of the regression equation Y

только сэкономить время, но и снизить финансовые затраты, вовремя переключившись на другую терапевтическую стратегию [19]. Как правило, для оценки прогрессирования опухоли при НМКРЛ используются сканирующие устройства. Помимо того, что такое обследование требует значительных финансовых затрат, оно неудобно для пациента [20]. Ранний прогноз прогрессирования после проведенного лечения, как полагают, позволит сэкономить время, средства и избежать побочных эффектов от неэффективного лечения [21, 22].

Имеется целая серия публикаций, в которых описаны результаты изучения возможности использовать биомаркеры при НМКРЛ для диагностики, прогнозирования исхода и мониторирования проводимого лечения. Наиболее широко с этой целью изучались раковый эмбриональный антиген (РЭА) и CYFRA 21-1 [19].

В ряде исследований отмечена связь этих биомаркеров с безрецидивной выживаемостью пациентов. Так, было показано, что концентрация CYFRA 21-1 и РЭА ассоциированы с безрецидивной и общей выживаемостью пациентов, у которых был выраженный НМКРЛ. Причем комбинация нормального уровня CYFRA 21-1 и высокого уровня РЭА сопутствует более продолжительному безрецидивному периоду и большей общей выживаемости [23]. Не обнаружено взаимосвязи между уровнем РЭА и риском рецидива в другом исследовании [24]. Сообщается, что только CYFRA 21-1 оказалась независимым прогностическим фактором общей выживаемости пациентов с I стадией НМКРЛ, но не другие маркеры [25]. А в тех исследованиях, где концентрация РЭА претендовала на роль предиктора опухолевой прогрессии, чувствительность составила 72 %, а специфичность – 47,1 % [26].

Заключение. Сочетание ретроспективного и проспективного исследований в нашей работе, статистических моделей Кокса, Каплана–Майера, логистической регрессии позволило отобрать, в зависимости от размеров опухоли и метастазирования, пациентов с III стадией НМКРЛ в группы высокого и низкого риска опухолевой прогрессии после проведенного лечения. Опираясь на эти данные, доказана важность для прогноза длительности безрецидивного периода трех белков в крови – участников воспаления. На основе уровней этих показателей составлено уравнение логистической регрессии. С его помощью путем проведения ROC-анализа определено пороговое значение, установлены прогностические чувствительность, специфичность, эффективность, прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов.

Итоги исследования дают основание рекомендовать измерение у пациентов с III стадией НМКРЛ на этапе поступления в стационар комплекса лабораторных показателей крови, включающего уровень CYFRA 21-1 и параметры рецепторов CXCR1 и CXCR2, с целью оценки у них риска прогрессирования опухоли в течение года после проведения лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Siegel, R. L. Cancer statistics, 2019 / R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal // CA: Cancer J. Clin. – 2019. – Vol. 69, N 1. – P. 7–34. https://doi.org/10.3322/caac.21551

2. Blackstock, A. W. Definitive chemoradiation for the treatment of locally advanced non small-cell lung cancer / A. W. Blackstock, R. Govindan // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25, N 26. – P. 4146–4152. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.6581

3. Govindan, R. Locally advanced non-small cell lung cancer: the past, present, and future / R. Govindan, J. Bogart, E. E. Vokes // J. Thorac. Oncol. – 2008. – Vol. 3, N 8. – P. 917–928. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318180270b

4. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований: клинический протокол / И. В. Ануфреенок [и др.]; под ред. О. Г. Суконко, С. А. Красного. – Минск: Проф. изд., 2019. – 613 с.

5. Evison, M. The current treatment landscape in the UK for stage III NSCLC / M. Evison // Br. J. Cancer. – 2020. – Vol. 123, suppl. 1. – P. 3–9. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01069-z

6. Prognostic value of serum tumor markers in patients with stage III NSCLC treated with chemoradiotherapy / T. Tokito [et al.] // In Vivo. – 2019. – Vol. 33, N 3. – P. 889–895. https://doi.org/10.21873/invivo.11555

7. Pretreatment FDG-PET metrics in stage III non-small cell lung cancer: ACRIN 6668/RTOG 0235 / N. Ohri [et al.]. // J. Natl. Cancer Inst. – 2015. – Vol. 107, N 4. – Art. djv004. https://doi.org/10.1093/jnci/djv004

8. CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304 / M. J. Edelman [et al.] // J. Thorac. Oncol. – 2012. – Vol. 7, N 4. – P. 649–654. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824a8db0

9. Does response to induction chemotherapy predict survival for locally advanced non-small-cell lung cancer? Secondary analysis of RTOG 8804/8808 / M. F. McAleer [et al.]. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. – 2010. – Vol. 76, N 3. – P. 802–808. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.053

10. Tumor volume as a potential imaging-based risk-stratification factor in trimodality therapy for locally advanced non-small cell lung cancer / M. M. Kozak [et al.] // J. Thorac. Oncol. – 2011. – Vol. 6, N 5. – P. 920–926. https://doi.org/10.1097/jto.0b013e31821517db

11. The systemic inflammatory response and its relationship to pain and other symptoms in advanced cancer / B. J. Laird [et al.] // Oncologist. – 2013. – Vol. 18, N 9. – P. 1050–1055. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0120

12. Ha, H. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in cancer and inflammatory diseases / H. Ha, B. Debnath, N. Neamati // Theranostics. – 2017. – Vol. 7, N 6. – P. 1543–1588. https://doi.org/10.7150/thno.15625

13. The clinical significance of CXCL5 in non-small cell lung cancer / K. Wu [et al.] // OncoTargets Ther. – 2017. – Vol. 10. – P. 5561–5573. https://doi.org/10.2147/OTT.S148772

14. Прогнозирование риска опухолевой прогрессии у пациентов с ранними стадиями аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого на основе лабораторных показателей / А. Д. Таганович [и др.] // Биомед. химия. – 2021. – Т. 67, № 6. – С. 507–517.

15. Дифференциация состояний «норма – патология». Методология установления референтных величин, диагностической и предсказательной информативности показателей лабораторных тестов: принципы оценки / В. С. Камышников // Лаб. диагн. Вост. Евр. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 9–25.

16. Uramoto, H. Prediction of recurrence after complete resection in patients with NSCLC / H. Uramoto, F. Tanaka // Anticancer Res. – 2012. – Vol. 32, N 9. – P. 3953–3960.

17. Histological grade: analysis of prognosis of non-small cell lung cancer after complete resection / M. Yasukawa [et al.] // In Vivo. – 2018. – Vol. 32, N 6. – P. 1505–1512. https://doi.org/10.21873/invivo.11407

18. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2016 / D. S. Ettinger [et al] // J. Natl. Compr. Cancer Netw. – 2016. – Vol. 14, N 3. – P. 255–264. https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0031

19. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis / S. Holdenrieder [et al.] // Br. J. Cancer. – 2017. – Vol. 116, N 8. – P. 1037–1045. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.45

20. Ganti, A. K. Lung cancer screening / A. K. Ganti, J. L. Mulshine // Oncologist. – 2006. – Vol. 11, N 5. – P. 481–487. https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-5-481

21. Zhi, X. Y. Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of primary lung cancer (2015 version) / X. Y. Zhi, J.-M. Yu, Y.-K. Shi // Cancer. – 2015. – Vol. 121, suppl. 17. – P. 3165–3181. https://doi.org/10.1002/cncr.29550

22. Assessment of a Combined Panel of Six Serum Tumor Markers for Lung Cancer / R. Molina [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2016. – Vol. 193, N 4. – P. 427–437. https://doi.org/10.1164/rccm.201404-0603OC

23. Predictive role of CYFRA21-1 and CEA for subsequent docetaxel in non-small cell lung cancer patients / K. Sone [et al.] // Anticancer Res. – 2017. – Vol. 37, N 9. – P. 5125–5131. https://doi.org/10.21873/anticanres.11932

24. Clinical value of p53, c-erbB-2, CEA and CA125 regarding relapse, metastasis and death in resectable non-small cell lung cancer / M. Pollán [et al.] // Int. J. Cancer. – 2003. – Vol. 107, N 5. – P. 781–790. https://doi.org/10.1002/ijc.11472

25. CA 19-9 and CA 125 as potential predictors of disease recurrence in resectable lung adenocarcinoma / S. Isaksson [et al.] // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, N 10. – P. e0186284. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186284

26. Evaluation of serum biomarker CEA and Ca-125 as immunotherapy response predictors in metastatic non-small cell lung cancer / M. R. Clevers [et al.] // Anticancer Res. – 2021. – Vol. 41, N 2. – P. 869–876. https://doi.org/10.21873/anticanres.14839

References

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2019, vol. 69, no. 1, pp. 7–34. https://doi.org/10.3322/caac.21551

2. Blackstock A. W., Govindan R. Definitive chemoradiation for the treatment of locally advanced non small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25, no. 26, pp. 4146–4152. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.6581

3. Govindan R., Bogart J., Vokes E. E. Locally advanced non-small cell lung cancer: the past, present, and future. *Journal of Thoracic Oncology*, 2008, vol. 3, no. 8, pp. 917–928. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318180270b

4. Anufreenok I. V., Dubrovskii A. Ch., Evmenenko A. A., Ermakov N. B., Zhavrid E. A., Zharkov V. V. [et al.]. *Algorithms for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms: clinical protocol*. Minsk, Professional'nye izdaniya Publ., 2019. 613 p. (in Russian).

5. Evison M. The current treatment landscape in the UK for stage III NSCLC. *British Journal of Cancer*, 2020, vol. 123, suppl. 1, pp. 3–9. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01069-z

6. Tokito T., Azuma K., Yamada K., Naito Y., Matsuo N., Ishii H., Natori H., Kinoshita T., Hoshino T. Prognostic value of serum tumor markers in patients with stage III NSCLC treated with chemoradiotherapy. *In Vivo*, 2019, vol. 33, no. 3, pp. 889–895. https://doi.org/10.21873/invivo.11555

7. Ohri N., Duan F., Machtay M., Gorelick J. J., Snyder B. S., Alavi A., Siegel B. A., Johnson D. W., Bradley J. D., DeNittis A., Werner-Wasik M. Pretreatment FDG-PET metrics in stage III non-small cell lung cancer: ACRIN 6668/RTOG 0235. *Journal of the National Cancer Institute*, 2015, vol. 107, no. 4, art. djv004. https://doi.org/10.1093/jnci/djv004

8. Edelman M. J., Hodgson L., Rosenblatt P. Y., Christenson R. H., Vokes E. E., Wang X., Kratzke R. CYFRA 21-1 as a prognostic and predictive marker in advanced non-small-cell lung cancer in a prospective trial: CALGB 150304. *Journal of Thoracic Oncology*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. 649–654. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824a8db0

9. McAleer M. F., Moughan J., Byhardt R. W., Cox J. D., Sause W. T., Komaki R. Does response to induction chemotherapy predict survival for locally advanced non-small-cell lung cancer? Secondary analysis of RTOG 8804/8808. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010, vol. 76, no. 3, pp. 802–808. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.053

10. Kozak M. M., Murphy J. D., Schipper M. L., Donington J. S., Zhou L., Whyte R. I. [et al.]. Tumor volume as a potential imaging-based risk-stratification factor in trimodality therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2011, vol. 6, no. 5, pp. 920–926. https://doi.org/10.1097/jto.0b013e31821517db

11. Laird B. J., McMillan D. C., Fayers P., Fearon K., Kaasa S., Fallon M. T., Klepstad P. The systemic inflammatory response and its relationship to pain and other symptoms in advanced cancer. *Oncologist*, 2013, vol. 18, no. 9, pp. 1050–1055. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0120

12. Ha H., Debnath B., Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics*, 2017, vol. 7, no. 6, pp. 1543–1588. https://doi.org/10.7150/thno.15625

13. Wu K., Yu S., Liu Q., Bai X., Zheng X., Wu K. The clinical significance of CXCL5 in non-small cell lung cancer. *OncoTargets and Therapy*, 2017, vol. 10, pp. 5561–5573. https://doi.org/10.2147/OTT.S148772

14. Taganovich A. D., Kovganko N. N., Prokhorova V. I., Murashko D. I., Got'ko O. V. Predicting the risk of tumor progression in patients with early stages of adenocarcinoma and squamous cell lung cancer based on laboratory parameters. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry], 2021, vol. 67, no. 6, pp. 507–517 (in Russian).

15. Kamyshnikov V. S. Differentiation of states "norm – pathology". Methodology for establishing reference values, diagnostic and predictive information content of laboratory test indicators: assessment principles. *Laboratornaya diagnostika. Vostochnaya Evropa = Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2018, vol. 7, no. 1, pp. 9–25 (in Russian).

16. Uramoto H., Tanaka F. Prediction of recurrence after complete resection in patients with NSCLC. *Anticancer Research*, 2012, vol. 32, no. 9, pp. 3953–3960.

17. Yasukawa M., Sawabata N., Kawaguchi T., Kawai N., Nakai T., Ohbayashi C., Taniguchi S. Histological grade: analysis of prognosis of non-small cell lung cancer after complete resection. *In Vivo*, 2018, vol. 32, no. 6, pp. 1505–1512. https://doi.org/10.21873/invivo.11407

18. Ettinger D. S., Wood D. E., Akerley W., Bazhenova L. A., Borghaei H., Camidge D. R. [et al.]. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 4.2016. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2016, vol. 14, no. 3, pp. 255–264. https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0031

19. Holdenrieder S., Wehnl B., Hettwer K., Simon K., Uhlig S., Dayyani F. Carcinoembryonic antigen and cytokeratin-19 fragments for assessment of therapy response in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 2017, vol. 116, no. 8, pp. 1037–1045. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.45

20. Ganti A. K., Mulshine J. L. Lung cancer screening. *Oncologist*, 2006, vol. 11, no. 5, pp. 481–487. https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-5-481

21. Zhi X. Y., Yu J.-M., Shi Y.-K. Chinese guidelines on the diagnosis and treatment of primary lung cancer (2015 version). *Cancer*, 2015, vol. 121, suppl. 17, pp. 3165–3181. https://doi.org/10.1002/cncr.29550. Erratum in: Cancer, 2016, vol. 122, no. 1, p. 162.

22. Molina R., Marrades R. M., Augé J. M., Escudero J. M., Viñolas N., Reguart N., Ramirez J., Filella X., Molins L., Agustí A. Assessment of a combined panel of six serum tumor markers for lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2016, vol. 193, no. 4, pp. 427–437. https://doi.org/10.1164/rccm.201404-0603oc

23. Sone K., Oguri T., Ito K., Kitamura Y., Inoue Y., Takeuchi A. [et al.]. Predictive role of cyfra21-1 and cea for subsequent docetaxel in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Research*, 2017, vol. 37, no. 9, pp. 5125–5131. https://doi.org/10.21873/anticanres.11932

24. Pollán M., Varela G., Torres A., de la Torre M., Ludeña M. D., Ortega M. D. [et al.]. Clinical value of p53, c-erbB-2, CEA and CA125 regarding relapse, metastasis and death in resectable non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 2003, vol. 107, no. 5, pp. 781–790. https://doi.org/10.1002/ijc.11472

25. Isaksson S., Jönsson P., Monsef N., Brunnström H., Bendahl P.-O., Jönsson M., Staaf J., Planck M. CA 19-9 and CA 125 as potential predictors of disease recurrence in resectable lung adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 10, p. e0186284. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186284

26. Clevers M. R., Kastelijn E. A., Peters B. J. M., Kelder H., Schramel F. M. N. H. Evaluation of serum biomarker CEA and Ca-125 as immunotherapy response predictors in metastatic non-small cell lung cancer. *Anticancer Research*, 2021, vol. 41, no. 2, pp. 869–876. https://doi.org/10.21873/anticanres.14839

Информация об авторах

Таганович Анатолий Дмитриевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ataganovich@gmail.com

Ковганко Николай Николаевич – канд. хим. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mikalai44@tut.by

Прохорова Виолетта Игоревна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: vprohorova@mail.ru

Колб Александр Владимирович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sanya.kolb@yandex.by

Готько Оксана Владимировна – ст. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (223040, а/г Лесной, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: babuka_05@mail.ru

Information about the authors

Anatoli D. Tahanovich – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ataganovich@gmail.com

Nikolai N. Kauhanka – Ph. D. (Chem.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mikalai44@tut.by

Violetta I. Prokhorova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: vprohorova@mail.ru

Alexander V. Kolb – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sanya.kolb@yandex.by

Oksana V. Got'ko – Senior Researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre (223040, Lesnoy, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: babuka_05@mail.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 577.96:578.233.42/44:616.36-006.6
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-126-139

Поступила в редакцию 20.02.2023
Received 20.02.2023

О. Е. Кузнецов

Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, Гродно, Республика Беларусь

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭКСПРЕССИИ ПРОТЕИНОВ NF1, p53, bcl-2, pRB С ДНК/РНК ВИРУСОВ И МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ *BRCA 1/2* и *hMSH2* ПРИ РАКЕ ПЕЧЕНИ

Аннотация. Среди опухолей желудочно-кишечного тракта заболеваемость и смертность от первичного рака печени остается высокой. За последние 20 лет заболеваемость раком печени в Беларуси увеличилась на 45,7 %.

Цель исследования – установить взаимосвязь экспрессии протеинов NF1, p53, bcl-2 и pRB с ДНК/РНК вирусов и мутациями генов *BRCA 1/2* и *hMSH2* при раке печени.

Обследованы пациенты (n = 303) с морфологически установленным первичным раком печени, гепатитом и здоровые лица. Выполнено молекулярно-биологическое и иммунологическое исследование уровней антител к протеинам клеточного цикла NF1, p53, bcl-2, pRB, ДНК/РНК вирусов, выявлены мутации генов *BRCA 1/2* и *hMSH2*. Уровни антител к p53, bcl-2, pRB и NF1 в сыворотке здоровых лиц отличались от аналогичных показателей в образцах крови и экстрактов ткани пациентов с гепатитом, раком печени и в образцах нативной ткани печени. Мутации при раке печени в опухолевой ткани составили 6,13 % (p = 0,004), в крови – 0,85 %. Изменения гена *hMSH2* в ткани установлены в 15,48 % случаев. В ткани опухоли выделены ДНК/РНК вируса простого герпеса 1-го и 2-го типа (56,1 %), вируса герпеса 6-го типа (24,4 %), цитомегаловируса (17,1 %), вируса гепатита С (17,1 %), вируса гепатита В (4,9 %), вируса папилломы человека (4,1 %), вируса Эпштейна–Барр (2,4 %), а также микст-персистирующих форм инфекций (26,8 %). При гепатите (С, В) и раке печени с носительством цитомегаловируса наблюдался рост экспрессии bcl-2, NF1 и pRB (p = 0,001). Наличие вируса Эпштейна–Барр приводило к активности белка p53 при раке печени (p = 0,003). Наличие протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1 в ткани печени не зависело от возраста и пола пациентов. Предполагается, что по степени их влияния на функцию генов, с учетом присутствующей в геноме ДНК/РНК вирусов и мутаций (*BRCA 1/2* и *hMSH2*), можно определить степень онкогенности вирусов. Превышение предсказанных для лиц возрастной группы 50,8 года концентраций p53, bcl-2, pRB и NF1 в крови свидетельствовало о риске развития/наличия опухолевого процесса в печени.

Ключевые слова: рак печени, гены *BRCA 1/2* и *hMSH2*, вирусы, клеточный цикл, опухоль

Для цитирования: Кузнецов, О. Е. Взаимосвязь экспрессии протеинов NF1, p53, bcl-2, pRB с ДНК/РНК вирусов и мутациями генов *BRCA 1/2* и *hMSH2* при раке печени / О. Е. Кузнецов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 126–139. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-126-139

Aleh E. Kuzniatsou

Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

RELATIONSHIP OF THE EXPRESSION OF THE NF1, p53, bcl-2, pRB PROTEINS WITH DNA/RNA OF VIRUSES AND MUTATIONS OF THE *BRCA 1/2* AND *hMSH2* GENES IN LIVER CANCER

Abstract. Among tumors of the gastrointestinal tract, the incidence and mortality from primary liver cancer remains high. Over the past 20 years, the incidence of liver cancer in Belarus has increased by 45.7 %.

The aim of the study was to establish the relationship between the expression of the NF1, p53, bcl-2 proteins and the pRB genes with DNA/RNA of viruses and mutations of the *BRCA 1/2* and *hMSH2* genes in liver cancer.

Patients (n = 303) with morphologically established primary liver cancer were examined. A molecular biological and immunological study was performed: antibodies to cell-cycle NF1, p53, bcl-2, pRB proteins, DNA/RNA of viruses, the *BRCA 1/2*, *hMSH2* gene. The levels of antibodies to p53, bcl-2, pRB, and NF1 in the serum of healthy individuals differed from those in blood samples and tissue extracts from patients with hepatitis C, liver cancer and in native liver tissue samples. Mutations in liver cancer were (p = 0.004): in the tumor tissue – 6.13 %, in the blood – 0.85 %. Changes in the *hMSH2* gene in the tissue were set at 15.48 %. DNA/RNA was isolated in the tumor tissue: HSV 1/2 – 56.1 %, HHV6 – 24.4, CMV – 17.1, HCV – 17.1, HBV – 4.9, HPV – 4.1, VEB – 2.4 %. Including mixed persistence – 26.8 %. In hepatitis (C, B) and liver cancer with CMV carriers, the expression of bcl-2, NF1 and pRb1 (p = 0.001) increases. The Epstein–Barr virus leads to the activity of the p53 protein in liver cancer (p = 0.003). The p53, bcl-2, pRB, and NF1 proteins in the liver tissue do not depend on the age and sex of patients. The degree of their influence on the function of genes with regard to DNA/RNA of viruses and mutations present in the genome (*BRCA 1/2*, *hMSH2*) suggests the degree of oncogenicity of viruses. The concentrations of p53, bcl-2, pRB, and

© Кузнецов О. Е., 2023

NF1 in the blood, exceeding the predicted ones, for 50.8 year old persons, indicate the risk of development/presence of a tumor process in the liver.

Keywords: liver cancer, *BRCA 1/2* and *hMSH2* genes, viruses, cell cycle, tumor

For citation: Kuzniatsou A. E. Relationship of the expression of the NF1, p53, bcl-2, pRB proteins with DNA/RNA of viruses and mutations of the *BRCA 1/2* and *hMSH2* genes in liver cancer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 126–139 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-126-139

Введение. Среди опухолей желудочно-кишечного тракта заболеваемость и смертность от рака гепатопанкреатобилиарной зоны составляют 37 и 48 %, а доля первичного рака печени (ПРП) – 25 и 33 % соответственно. За последние 20 лет заболеваемость ПРП в Беларуси увеличилась на 45,7 % (ежегодный прирост – 1,7 %), а к 2025 г. прогнозируется увеличение на 5,9 % [1, 2].

Из почти 19 млн новых случаев рака, выявленных в 2020 г. (GLOBOCAN, 2020), 15,7 % были связаны с различными видами хронических инфекций. При этом главенствующая роль в инфекционном канцерогенезе принадлежала различным ДНК/РНК-вирусам (51,2–64,2 %) [3].

В изучении этиопатогенеза рака огромную роль сыграло открытие генов с герминальными мутациями, ассоциированными с высоким риском развития онкопатологии [4]. Мутации в высокопенетрантных генах (*BRCA1*, *BRCA2*, *hMSH2* и *hMLH1*) повышают риск развития рака в 10 раз [4–6].

Белок p53, являясь продуктом гена *TP53*, локализуется в ядре и находится на 17-й хромосоме, препятствуя возникновению злокачественных новообразований. Установлена супрессорная роль протеина p53 в регуляции большинства генов. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК результатом активации p53 являются репликации ДНК и запуск апоптоза белками [7].

Показано, что сверхэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 в лимфоцитах сама по себе не вызывает рак, однако одновременная сверхэкспрессия Bcl-2 и протоонкогена myc может способствовать появлению злокачественных новообразований [8–10]. В результате однофакторного регрессионного анализа установлено прогностическое значение bcl-2 и p53 при раке легкого, в то время как многофакторный регрессионный анализ не выявил взаимосвязи показателей bcl-2, p53 и bax с прогнозом исхода болезни [11].

Ген *NF1* неврофиброматоза [17q112/NF1], продуктом которого является цитоплазматический белок нейрофибромин, регулирует активность белков гена *RAS*, а мутации одного из генов *RAS* обнаруживаются в 15 % случаев злокачественных новообразований у человека. Исследование гена *KRAS2* при раке толстой кишки показало наличие многосторонних взаимосвязей *NF1* с различными молекулами, вовлеченными в канцерогенез, что свидетельствует об усилении экспрессии антиапоптического белка MCL1 (myeloid cell leukemia 1) при нокдауне *NF1* [12].

Одним из потенциальных маркеров онкогенеза является ретинобластомный белок (pRB, ядерный фосфопротеин), препятствующий пролиферации и способствующий окончательной дифференцировке клеток [13]. В вирустрансформированных клетках С-концевая область pRB способна формировать специфические комплексы с трансформирующими белками некоторых ДНК-содержащих онкогенных вирусов, включая большой Т-клеточный антиген вируса SV40, белки аденовируса E1A и человеческого вируса папилломы E7. В случае отсутствия данного белка или невозможности осуществления его функции происходит сбой в регуляции деления клетки, что приводит к опухолевой трансформации [14, 15].

Анализ проведенных исследований в области молекулярной биологии клеточного цикла при злокачественной трансформации показал противоречивый характер связи маркеров апоптоза (p53, bcl-2), протеинов гена *NF1* и pRB с различными механизмами онкогенеза, что стало одной из причин установления ассоциативных взаимоотношений между различными вирусами и мутациями различных генов при раке печени.

Цель исследования – установить взаимосвязь экспрессии протеинов NF1, p53, bcl-2 и pRB с ДНК/РНК вирусов и мутациями генов *BRCA 1/2* и *hMSH2* при раке печени.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были 303 пациента белорусской этнопринадлежности, проживающих в Гродненском регионе, с морфологически установ-

ленным ПРП; 43 образца ткани от пациентов с ПРП; 63 образца сыворотки крови от пациентов с ПРП; 60 и 66 образцов сыворотки крови от пациентов с хроническим гепатитом В и С (ХГВ, ХГС) соответственно; 31 образец ткани от пациентов с отсутствием опухолевого процесса; 80 образцов сыворотки крови от практически здоровых лиц.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

В соответствии с Международной гистологической классификацией образцы ткани опухоли (63 клинических случая) при ПРП (С22, n = 62) были идентифицированы как гепатоцеллюлярный рак (ГЦР). Промежуток времени установления диагноза ПРП составил от 6 мес. до 13 лет. Образцы нативной ткани печени, полученные при диагностической биопсии органа и при операционных вмешательствах, были представлены следующими вариантами: не измененная; не модифицированная; сохранившая структуру, присущую живой клетке; отсутствие злокачественного процесса – рака печени.

Были выделены следующие исследовательские группы: группа 1 (n = 66) – пациенты с ХГС; группа 2 (n = 60) – пациенты с ХГВ; группа 3 (n = 63) – пациенты с ПРП (исследуемый материал – сыворотка крови); группа 4 (n = 43) – пациенты с ПРП (материал – ткань печени); группа 5 (n = 31) – образцы нативной ткани (НТ) печени (не измененная, не модифицированная НТ, которая сохранила присущую живой клетке структуру и в которой отсутствовал злокачественный процесс).

Материал контрольной группы (к) был представлен образцами крови 80 практически здоровых лиц (50/62,5 % мужчин и 30/37,5 % женщин, средний возраст 56,5 ± 8,3 года), у которых на момент обследования не было родственников со злокачественными новообразованиями и вирусными инфекциями.

Пациенты находились на лечении в Гродненском областном клиническом онкологическом диспансере и в Гродненской областной инфекционной клинической больнице. Образцы тканей пациентов получены из архива Гродненского областного клинического патологоанатомического бюро. Образцы экстракта ткани печени (n = 43) изучали в двух зонах: в зоне опухоли и на участке здоровой ткани с отсутствием признаков злокачественности.

Определяли следующие вирусологические и молекулярно-биологические маркеры: антитела к протеинам NF1, p53, bcl-2, pRB, ДНК/РНК генома вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ, HHV4), вируса гепатита В (ВГВ)/HBV, вируса гепатита С (ВГС)/HCV, папилломы человека (ВПЧ/HPV), цитомегаловируса (ЦМВ/CMV), простого герпеса 1/2 типа (ВПГ 1/2; HSV 1/2), вируса герпеса 6-го типа (HHV6), ген *BRCA1* (экзоны 2, 5, 11, 20), ген *BRCA2* (экзон 11), ген *hMSH2* (экзоны 1–16).

Концентрацию антител к протеинам NF1, p53, bcl-2 и pRB определяли на иммуноферментном анализаторе Mindray 96RA (Китай) с помощью метода иммуноферментного анализа в образцах ткани и сыворотки крови пациентов, используя набор реагентов FineTest производства Wuhan Fine Biological Technology Co., Ltd. (Китай). Из блоков ткани в парафине готовили серийные срезы. В соответствии со стандартным протоколом проводили пробоподготовку образцов ткани к исследованию с помощью набора реагентов производства MagneSil Genomic, Fixed System (Promega, США). Образцы биологического материала (сыворотки крови) получали стандартным способом с использованием вакуумных систем Vacuette с активатором свертывания производства Greiner Bio-One, Австрия. Подготовку проб крови для исследования проводили унифицированным способом – центрифугированием (центрифуга Fenox-24M, Китай) при 3000 g в течение 10 мин.

Всего выполнено 287 исследований детекции ДНК/РНК генома указанных вирусов, в 143 случаях (анализ 946 детекций) – исследование генов *BRCA1*, *BRCA2* и *hMSH2*.

Для выделения ДНК/РНК (ПЦР) из образцов ткани использовали тест-системы Applied Biosystems (США), MagneSil Genomic, Fixed System (Promega, США), QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия), руководствуясь инструкциями производителей. Геномную ДНК/РНК из образцов крови выделяли при помощи наборов «ДНК/РНК Сорб В» (Россия) в соответствии с инструкцией. Амплификацию экзонов генов проводили, используя наборы Pronto Diagnostics Ltd. (Израиль) для детекции генов *BRCA1* (*185delAG*, *4145delA*, *5382insC*), *BRCA2* (*6174delT*) и *hMSH2* (MLPA Tests: HNPCC-deletion/duplication – Diagnosis of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer

(HNPCC), Pronto Diagnostics Ltd. (Израиль). Параллельно с помощью оригинального набора реагентов на основе отечественных праймеров определяли изменения в экзонах гена *hMSH2* [16].

Амплификацию ДНК/РНК вирусов выполняли по заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе-термоциклере RotorGene (Германия), используя тест-системы Amplisens (Россия), дополнительный контроль количественных и качественных характеристик ДНК/РНК – на спектрофотометре BioPhotometer Plus (Eppendorf, Германия).

Статистическая обработка данных проведена с помощью стандартного пакета прикладных статистических программ SPSS. Различие между изучаемыми параметрами признавали достоверным при $p < 0,05$. Использовали следующие методы математической обработки: изучение вида распределения и получение числовых характеристик, включая расчет M ± σ, Q75, Q и Me; выявление отклика на воздействие в двухвыборочной задаче, включая *t*-тест Манна–Уитни (*U*) и тест Вилкоксона (Z); метод Хила; ROC-анализ (площадь под ROC-кривой – AUC) [17]; модели множественной линейной регрессии; коэффициент корреляции Пирсона (*r*) и непараметрический корреляционный анализ Спирмена (R).

Результаты и их обсуждение. Установленные в образцах сыворотки крови концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, pRB и NF1 у практически здоровых лиц, в образцах крови и экстрактах ткани пациентов с ХГВ, ХГС и ПРП представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, референтные уровни антител в сыворотке к протеинам p53, bcl-2, pRB и NF1 у здоровых лиц отличались от аналогичных показателей в исследуемых образцах сыворотки крови и экстрактов ткани пациентов с ХГВ и ХГС, ПРП (ткань, сыворотка) и в образцах НТ печени при отсутствии морфологически доказанного ПРП (Mann–Whitney *U* test – $p < 10^{-5}$).

Концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, pRB и NF1 в образцах НТ (при отсутствии ПРП) можно расценивать как вариант возможной «нормы» (референтные величины), которая составила: для протеинов p53 – 23,136 ± 8,744 нг/мл; для bcl-2 – 34,265 ± 9,930 нг/мл; для pRb1 – 4,121 ± 0,745 нг/мл, для NF1 – 4204,194 ± 743,706 пг/мл ($p_{5\text{-}2} = 0,000001$, $p_{5\text{-}3} = 0,000003$, $p_{4\text{-}5} = 0,000001$, $p_{5\text{-}3} = 0,00012$ соответственно).

Анализ зависимости уровня экспрессии протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1 позволил установить наличие достоверных корреляционных связей между данными маркерами в группах (корреляции Спирмена, Кендалла):

p53 (контроль) и p53 (ХГВ): $r = 0,601$, $p = 0,001$;

pRb1 (контроль) и bcl-2 (ПРП, ткань): $r = 0,413$, $p = 0,0021$; pRb1 (контроль) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): $r = 0,414$, $p = 0,0021$;

p53 (ПРП, ткань) и p53 (ПРП, сыворотка): $r = 0,970$, $p = 0,0001$; p53 (ПРП, ткань) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): $r = 0,515$, $p = 0,003$;

bcl-2 (ПРП, ткань) и pRb1 (контроль): $r = 0,413$, $p = 0,002$; bcl-2 (ПРП, ткань) и p53 (ПРП, сыворотка): $r = 0,504$, $p = 0,0016$; bcl-2 (ПРП, ткань) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): $r = 1,00$, $p = 0,00001$; bcl-2 (ПРП, ткань) и p53 (ХГВ): $r = 0,468$, $p = 0,0019$; bcl-2 (ПРП, ткань) и pRb1 (ХГВ): $r = 0,514$, $p = 0,003$;

pRb1 (ПРП, ткань) и bcl-2 (НТ): $r = 0,404$, $p = 0,004$; pRb1 (ПРП, ткань) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): $r = 0,524$, $p = 0,003$; pRb1 (ПРП, ткань) и pRb1 (ПРП, сыворотка): $r = 1,00$, $p = 0,00001$; pRb1 (ПРП, ткань) и pRb1 (ХГВ): $r = 0,628$, $p = 0,002$;

NF1 (ПРП, ткань) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): $r = 0,623$, $p = 0,002$; NF1 (ПРП, ткань) и pRb1 (ПРП, сыворотка): $r = 0,721$, $p = 0,001$; NF1 (ПРП, ткань) и pRb1 (ХГВ): $r = 0,652$, $p = 0,0019$;

bcl-2 (НТ) и pRb1 (ПРП, ткань): $r = 0,404$, $p = 0,004$; bcl-2 (НТ) и pRb1 (ПРП, сыворотка): $r = 0,404$, $p = 0,009$;

pRb1 (НТ) и NF1 (ХГВ): $r = 0,384$, $p = 0,01$;

NF1 (НТ) и NF1 (ПРП, сыворотка): $r = 0,403$, $p = 0,01$;

p53 (ПРП, сыворотка) и p53 (ПРП, ткань): $r = 0,970$, $p = 0,0001$; p53 (ПРП, сыворотка) и bcl-2 (ПРП, ткань): $r = 0,504$, $p = 0,0016$;

bcl-2 (ПРП, сыворотка) и pRb1 (контроль): $r = 0,413$, $p = 0,001$; bcl-2 (ПРП, сыворотка) и p53 (ПРП, ткань): $r = 0,515$, $p = 0,002$; bcl-2 (ПРП, сыворотка) и bcl-2 (ПРП, ткань): $r = 1,00$, $p = 0,00001$; bcl-2 (ПРП, сыворотка) и pRb1 (ПРП, ткань): $r = 0,524$, $p = 0,003$; bcl-2

Т а б л и ц а 1. **Концентрации антител к протеинам p53, bcl-2, pRB и протеинам гена *NF1* в образцах сыворотки крови и ткани**

T a b l e 1. **Concentrations of antibodies to p53, bcl-2, pRB proteins and NF1 gene proteins in blood serum and tissue samples**

Группа	Показатель (образец)	M	m	min	max	*p*
Здоровые (*n* = 80)	p53, нг/мл (сыворотка)	2,541	4,177	0,90	17,30	$p_{к\text{-}2}=0{,}0053$ $p_{к\text{-}3}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}4}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}5}=0{,}000001$
	bcl-2, нг/мл (сыворотка)	8,006	6,105	1,01	30,90	$p_{к\text{-}1}=0{,}000001$ $p_{к\text{-}2}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}3}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}4}=0{,}000001$ $p_{к\text{-}5}=0{,}000001$
	pRb1, нг/мл (сыворотка)	0,309	0,097	0,18	0,51	$p_{к\text{-}1}=0{,}0034$ $p_{к\text{-}2}=0{,}0001$ $p_{к\text{-}3}=0{,}000001$ $p_{к\text{-}4}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}5}=0{,}00001$
	NF1, пг/мл (сыворотка)	1077,857	132,472	840,00	1285,00	$p_{к\text{-}1}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}2}=0{,}00001$ $p_{к\text{-}3}=0{,}000001$ $p_{к\text{-}4}=0{,}000001$ $p_{к\text{-}5}=0{,}000001$
Группа 1 (*n* = 66)	p53, нг/мл (сыворотка)	4,188	5,348	0,90	20,45	$p_{1\text{-}3}=0{,}000001$ $p_{1\text{-}4}=0{,}00001$ $p_{1\text{-}5}=0{,}000001$
	bcl-2, нг/мл (сыворотка)	34,423	13,109	14,60	56,00	
	pRb1, нг/мл (сыворотка)	4,684	6,869	0,33	22,20	
	NF1, пг/мл (сыворотка)	4110,769	3554,32	2140,0	15155,00	
Группа 2 (*n* = 60)	p53, нг/мл (сыворотка)	7,730	11,418	0,90	36,10	$p_{2\text{-}3}=0{,}0009$ $p_{2\text{-}5}=0{,}00001$
	bcl-2, нг/мл (сыворотка)	32,653	12,946	15,60	56,00	
	pRb1, нг/мл (сыворотка)	4,842	6,711	0,33	22,20	
	NF1, пг/мл (сыворотка)	4422,333	3472,53	2140,0	15155,00	
Группа 3 (*n* = 63)	p53, нг/мл (сыворотка)	25,446	14,915	2,763	79,20	
	bcl-2, нг/мл (сыворотка)	36,861	13,025	5,635	50,60	
	pRb1, нг/мл (сыворотка)	5,803	1,412	3,74	10,63	$p_{3\text{-}5}=0{,}0003$
	NF1, пг/мл (сыворотка)	3196,212	488,666	2512,5	8590,00	$p_{3\text{-}5}=0{,}00001$
Группа 4 (*n* = 43)	p53, нг/мл (ткань)	25,453	14,803	3,25	72,00	$p_{4\text{-}2}=0{,}00008$
	bcl-2, нг/мл (ткань)	32,053	11,326	4,90	44,00	$p_{4\text{-}3}=0{,}000001$
	pRb1, нг/мл (ткань)	6,827	1,661	4,40	12,50	$p_{4\text{-}3}=0{,}000001$
	NF1, пг/мл (ткань)	3786,667	527,671	3350,0	5400,00	$p_{4\text{-}3}=0{,}0005$ $p_{4\text{-}5}=0{,}015$
Группа 5 (*n* = 31)	p53, нг/мл (НТ)	23,136	8,744	4,78	35,50	$p_{5\text{-}2}=0{,}000001$
	bcl-2, нг/мл (НТ)	34,265	9,930	12,20	48,70	
	pRb1, нг/мл (НТ)	4,121	0,745	2,70	6,80	$p_{5\text{-}3}=0{,}000003$ $p_{4\text{-}5}=0{,}000001$
	NF1, пг/мл (НТ)	4204,194	743,706	1990,0	5210,00	$p_{5\text{-}3}=0{,}00012$

П р и м е ч а н и е. НТ – нативная ткань с отсутвием злокачественного процесса.

bcl-2 (ПРП, сыворотка) и NF1 (ПРП, ткань): r = 0,623, p = 0,002; bcl-2 (ПРП, сыворотка) и p53 (ХГВ): r = 0,468, p = 0,009; bcl-2 (ПРП, сыворотка) и pRb1 (ХГВ): r = 0,514, p = 0,004;

pRb1 (ПРП, сыворотка) и bcl-2 (ПРП, ткань): r = 0,524, p = 0,004; pRb1 (ПРП, сыворотка) и pRb1 (ПРП, ткань): r = 1,00, p = 0,00001; pRb1 (ПРП, сыворотка) и NF1 (ПРП, ткань): r = 0,721, p = 0,004; pRb1 (ПРП, сыворотка) и bcl-2 (НТ): r = 0,404, p = 0,007; pRb1 (ПРП, сыворотка) и pRb1 (ХГВ): r = 0,628, p = 0,003;

NF1 (ПРП, сыворотка) и NF1 (НТ): r = 0,403, p = 0,002;

p53 (ХГВ) и p53 (контроль): r = 0,601, p = 0,002; p53 (ХГВ) и bcl-2 (ПРП, ткань): r = 0,468, p = 0,01; p53 (ХГВ) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): r = 0,468, p = 0,02;

pRb1 (ХГВ) и bcl-2 (ПРП, ткань): r = 0,514, p = 0,002; pRb1 (ХГВ) и pRb1 (ПРП, ткань): r = 0,628, p = 0,003; pRb1 (ХГВ) и NF1 (ПРП, ткань): r = 0,652, p = 0,002; pRb1 (ХГВ) и bcl-2 (ПРП, сыворотка): r = 0,514, p = 0,002; pRb1 (ХГВ) и pRb1 (ПРП, сыворотка): r = 0,628, p = 0,003;

NF1 (ХГВ) и pRb1 (НТ): r = 0,384, p = 0,03.

Анализ значимости установленных корреляционных связей регуляторов апоптоза Bcl-2, p53, Rb и NF1 в группах показал наиболее выраженную зависимость между протеинами клеточного цикла при ХГВ и ПРП как в сыворотке крови, так и в образцах экстрактов ткани.

Частота выявления мутаций генов (*BRCA1*, *BRCA2*, *hMSH2*) среди здоровых лиц составила 1,25 % для *BRCA1* (экзон 20, женщина, 47 лет, сельский житель) и 1,25 % для *hMSH2* (экзон 11, женщина 52 лет, городской житель). Мутаций экзонов гена *BRCA2* в контрольной группе не обнаружено [18].

Встречаемость мутаций в экзонах генов в образцах ткани и крови лиц с установленным диагнозом ПРП представлена в табл. 2.

Общее количество мутаций в образцах при ПРП составило 58/6,13 % в образцах опухолевой ткани и 8/0,85 % в образцах крови (p = 0,004). Встречаемость генетических изменений в гене *hMSH2* по 1–16-му экзонам гена в образцах тканей при ПРП составила 52/15,48 %.

Как видно из табл. 2, количество изменений в гене варьировалось и было чаще в экзоне 9 гена *hMSH2* (11/52,38 %), экзоне 1 (10/47,62 %), экзоне 6 (6/28,57 %), экзоне 8 (5/23,81 %), экзоне 2 (4/19,05 %), экзонах 1 и 11 (по 8/29,6 %), экзоне 2 (6/22,2 %), экзонах 4, 12 и 16 (по 3/14,29 %), экзонах 7 и 14 (по 2/9,52 %), экзонах 3, 5 и 10 (по 1/4,76 %).

Детектируемость мутаций в гене *hMSH2* в образцах крови у лиц с ПРП составила 6/1,79 %. Одновременное присутствие мутации гена *hMSH2* в образцах крови и опухолевой ткани у пациентов, позволяет предположить наследственный механизм возникновения ПРП.

В образцах опухолевой ткани и крови пациентов с диагнозом ПРП мутации генов *BRCA1* и *BRCA2* детектированы с частотой 0,63 % в ткани и 0,21 % в крови от числа всех исследуемых образцов (n = 946). Анализ удельного веса изменений в гене среди лиц женского пола с этим диагнозом показал, что на образцы ткани приходится 6/24,0 % случаев, на образцы крови – 2/8,0 % (p < 0,05).

Таблица 2. **Частота выявления мутаций генов *BRCA 1/2* и *hMSH2* в образцах ткани и крови у лиц с ПРП**

Table 2. **Detection frequency of mutations in the *BRCA 1/2* and *hMSH2* genes in tissue and blood samples from humans with liver cancer**

Исследуемый ген (экзон)	Кол-во образцов	Кол-во мутаций			
		Ткань		Кровь	
		n	%	*n*	%
BRCA1 (5)	122	1*	0,82	1*	0,82
BRCA1 (2)	122	1*	0,82	1*	0,82
BRCA1 (20)	122	2*	1,64	0*	0,00
BRCA1 (11)	122	0*	0,00	0*	0,00
BRCA2 (11)	122	2*	1,64	0*	0,00
hMSH2 (1)	21	10	47,62	1	4,76
hMSH2 (2)	21	4	19,05	0	0,00
hMSH2 (3)	21	1	4,76	0	0,00
hMSH2 (4)	21	3	14,29	0	0,00
hMSH2 (5)	21	1	4,76	0	0,00
hMSH2 (6)	21	6	28,57	1	4,76
hMSH2 (7)	21	2	9,52	0	0,00
hMSH2 (8)	21	5	23,81	0	0,00
hMSH2 (9)	21	11	52,38	3	14,29
hMSH2 (10)	21	1	4,76	0	0,00
hMSH2 (11)	21	0	0,00	0	0,00
hMSH2 (12)	21	3	14,29	1	4,76
hMSH2 (13)	21	0	0,00	0	0,00
hMSH2 (14)	21	2	9,52	0	0,00
hMSH2 (15)	21	0	0,00	0	0,00
hMSH2 (16)	21	3	14,29	0	0,00
Всего	946	58	6,13	8	0,85

Примечание. * – образцы тканей лиц женского пола (n = 25).

Встречаемость мутаций генов *BRCA 1/2* среди лиц женского пола имела значимые ранговые корреляции при ПРП с экзонами гена *hMSH2*:

экзон 5 гена *BRCA1* и экзон 11 гена *BRCA2*: $r_s = 0{,}704$, $p < 0{,}05$;

экзон 20 гена *BRCA1* и экзон 10 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}689$, $p < 0{,}05$; экзон 6 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}512$, $p < 0{,}05$; экзон 14 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}447$, $p < 0{,}05$;

экзон 5 гена *BRCA1* и 11 гена *BRCA2*: $r_s = 0{,}704$, $p < 0{,}05$;

экзон 2 гена *BRCA1* и 11 гена *BRCA2*: $r_s = 0{,}704$, $p < 0{,}05$.

По результатам исследования мутаций в ткани и крови по экзонам генов *hMSH2*, *BRCA1* и *BRCA2* (разведочный и корреляционный анализ) установлено, что компонента экзонов 6 и 12 гена *hMSH2* и экзона 5 гена *BRCA1* с выявленной мутационной характеристикой в крови (вероятностной наследственной, вероятностной спонтанной и/или индуцированной) обеспечивает варьирование следующих изменений в ткани:

экзон 8 гена *hMSH2* и экзон 11 гена *BRCA2*: $r_s = 0{,}580$; $p < 0{,}05$; экзон 9 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}533$, $p < 0{,}05$;

экзон 1 гена *hMSH2* и экзон 11 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}508$, $p < 0{,}05$;

экзон 3 гена *hMSH2* и экзон 12 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}547$, $p < 0{,}05$;

экзон 10 *hMSH2* и экзон 12 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}547$, $p < 0{,}05$; экзон 14 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}689$, $p < 0{,}05$;

экзон 6 гена *hMSH2* и экзон 2 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}766$; $p < 0{,}05$; экзон 10 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}689$, $p < 0{,}05$; экзон 12 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}645$; $p < 0{,}05$; экзон 14 гена *hMSH2*: $r_s = 0{,}794$; $p < 0{,}05$.

Во всех случаях факторного анализа (главная компонента) выделены изменения в экзонах 6 ($F = 0{,}829$, $p < 0{,}05$) и 12 гена *hMSH2* ($F = 0{,}738$, $p < 0{,}05$).

Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах тканей при ПРП представлена в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. **Частота выявления ДНК/РНК вирусов в образцах ткани при ПРП**

T a b l e 3. **Detection frequency of DNA/RNA of viruses in tissue samples from humans with liver cancer**

Вирусы	Общее число	Выделенные ДНК/РНК	Женский пол		Мужской пол	
			n	%	*n*	%
ВПЧ	41	2/4,9	0	0	2*	4,9
ВПГ 1/2	41	23/56,1	15	36,6	8	19,5
ЦМВ	41	7/17,1	2	4,9	5	12,2
ВЭБ	41	1/2,4	1	2,4	0	0
ВГВ	41	2/4,8	1	2,4	1	2,4
ВГС	41	7/17,1	1	2,4	6	14,6
ВПГ6	41	10/24,4	1	2,4	9	21,9
ЦМВ + HCV + HHV6	41	1/2,4	1	2,4		
ВПГ 1/2 типа + HCV + HHV6	41	1/2,4			1	2,4
ЦМВ + ВПГ6	41	2/4,9			2	4,9
ЦМВ + HCV	41	1/2,4	1	2,4		
ВПГ 1/2 + HHV6	41	2/4,9	2	4,9		
HCV + HHV6	41				1	2,4
HBV + ВЭБ	41				1	2,4
ВПГ1/2 + ЦМВ	41	2/4,9			2	4,9

Как видно из табл. 3, при ПРП выделение вирусной ДНК/РНК из ткани опухоли составило: ВПГ 1/2 – 56,1 %, HHV6 – 24,4, ЦМВ – 17,1, HCV – 17,1, HBV – 4,9, ВПЧ – 4,1, ВЭБ – 2,4 %. Микст-персистирование вирусов (более одного ДНК/РНК в одном образце) выявлено в 11/26,8 % случаев, одновременное наличие двух вирусов – в 9/21,9 %, трех вирусов – в 2/4,9 %.

Между выявленными генетическими изменениями в опухолевой ткани и образцах крови установлены зависимости с ДНК/РНК исследуемых вирусов ($p < 0{,}05$), в частности:

носительство мутаций гена *BRCA1*, экзон 5 – ВГП 1/2 ($r_s = 0{,}291$);

носительство мутаций гена *BRCA1*, экзон 2 – ЦМВ (r_s = 0,292) и ВГВ (r_s = 0,261);

носительство мутаций гена *BRCA2*, экзон 11 – ВПЧ 16/18 типов (r_s = 0,702038) и ВПЧ 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59-го типов (r_s = 0,486);

носительство ВЭБ – ВГВ (r_s = 0,281);

носительство мутаций гена hMSH2, экзон 9 – ВГС (r_s = 0,391).

Принимая во внимание установленную связь экспрессии исследуемых протеинов клеточного цикла контрольной группы с инфекционным (ДНК/РНК вирусов) и опухолевым процессами и зафиксированную частоту мутаций генов *BRCA1*, *BRCA2*, гена *hMSH2* и ДНК/РНК вирусов в исследуемых группах, выполнен анализ оценки вероятных зависимостей между экспрессией протеинов p53, bcl-2, pRB, NF1, мутациями генов и ДНК/РНК вирусов.

В результате установлено, что вирусы имели корреляционную связь с белками клеточного цикла в следующих исследуемых группах:

ЦМВ и bcl-2 (при ХГС): r = –0,415, p = 0,001; CMV и NF1 (ПРП, ткань) – r = 0,475, p = 0,001;

ВГВ и pRb1 (при ХГВ): r = –0,371, p = 0,003;

ВЭБ и NF1 (при ХГС): r = 0,418, p = 0,002; ВЭБ и p53 (ПРП, сыворотка) – r = 0,385, p = 0,003;

HHV6 и NF1 (при ХГС) – r = 0,485, p = 0,001.

Установленные отрицательные и положительные корреляционные зависимости в группах лиц с ХГВ, ХГС и ПРП заслуживают особого внимания у лиц с носительством ЦМВ при ХГС, когда возрастает уровень экспрессии bcl-2 и повышается концентрация «хранителей клеточного цикла» – *NF1* (p = 0,001). Аналогичные изменения в клеточном цикле происходят и при носительстве вирусной ДНК ВГВ, что способствует увеличению экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста pRb1. ВЭБ показал положительную корреляционную связь, что ведет к активности регулирующего клеточный цикл белка p53 у лиц с установленным раком печени в ткани (p = 0,003).

Выявлены следующие корреляционные зависимости между уровнями p53, bcl-2, pRB и NF1 и мутациями генов *BRCA1*, *BRCA2*, *hMSH2* (экзоны 1–16):

ген *BRCA2* (экзон 11) и p53 (контроль): r = 0,448, p = 0,002; ген *BRCA2* (экзон 11) и pRb1 (ПРП, ткань): r = 0,389, p = 0,03; ген *BRCA2* (экзон 11) и pRb1 (ПРП, сыворотка): r = 0,389, p = 0,001; ген *BRCA2* (экзон 11) и NF1 (ПРП, сыворотка): r = 0,361, p = 0,0019; ген *BRCA2* (экзон 11) и p53 (ВГВ): r = 0,404, p = 0,003;

ген *hMSH2* (экзон 1) и NF1 (ВГС): r = –0,550, p = 0,001;

ген *hMSH2* (экзон 4) и p53 (контроль): r = 0,519, p = 0,002;

ген *hMSH2* (экзон 7) и bcl-2 (ВГС): r = –0,507, p = 0,0019; ген *hMSH2* (экзон 7) и NF1 (контроль) r = 0,509, p = 0,0016; ген *hMSH2* (экзон 7) и pRb1 (ВГВ): r = 0,510, p = 0,001; ген *hMSH2* (экзон 7) и bcl-2 (ВГВ): r = 0,456, p = 0,01;

ген *hMSH2* (экзон 8) и p53 (ПРП, сыворотка): r = 0,452, p = 0,0012;

ген *hMSH2* (экзон 9) и pRb1 (ВГС): r = 0,504, p = 0,003; ген *hMSH2* (экзон 9) и pRb1 (ПРП, ткань): r = 0,444, p = 0,004; ген *hMSH2* (экзон 9) и pRb1 (ПРП, сыворотка): r = 0,444, p = 0,004;

ген *hMSH2* (экзон 14) и p53 (ПРП, ткань): r = 0,443, p = 0,004;

ген *hMSH2* (экзон 16) и p53 (контроль): r = 0,519, p = 0,003.

Как и в случае с вирусной ДНК/РНК, показаны положительные и отрицательные корреляционные зависимости в группах. Интерес вызывали гены *BRCA2* (экзон 11) и *hMSH2* (экзоны 4, 7, 16), когда у лиц с ХГС наличие мутаций способствовало увеличению концентрации актител к протеинам p53 и NF1 (*BRCA2*, p = 0,002), а при отсутствии мутаций в экзонах 1 и 7 гена *hMSH2* – увеличению концентрации антител к протеинам NF1 и bcl-2 (p = 0,001 и p = 0,0019 соответственно). При ХГВ и ПРП рост концентраций белков p53, bcl-2, pRB и NF1 установлен при наличии мутаций в генах *BRCA2* (экзон 11) и *hMSH2* (экзоны 1, 8, 9, 11, 14), $p < 0,05$.

Анализ концентраций протеинов в образцах сыворотки крови и ткани опухоли не обнаружил достоверной зависимости ни от возраста (Median test, p = 0,288), ни от пола (Median test, p = 0,331) (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. **Коррелиционные связи между уровнем экспрессии протеинов клеточного цикла (p53, bcl-2, pRB, NF1), возрастом и полом при ПРП**

T a b l e 4. **Correlations between the level of expression of cell cycle proteins (p53, bcl-2, pRB, NF1), age and gender in humans with liver cancer**

Показатель	Возраст, пол	bcl-2, нг/мл	pRb1, нг/мл	NF1, пг/мл
Возраст, пол	1,000000	0,386271	–0,313515	–0,021714
bcl-2, нг/мл	0,386271	1,000000	–0,524570	0,088864
pRb1, нг/мл	–0,313515	–0,524570	1,000000	–0,287655
NF1, пг/мл	–0,021714	0,088864	–0,287655	1,000000

На основании анализа зависимости протеинов клеточного цикла p53, bcl-2, pRB и NF1 в образцах ткани опухолевой природы и сыворотки крови обследованных был сделан вывод о том, что концентрация протеинов клеточного цикла p53, bcl-2, pRB и NF1 в ткани не зависит от возраста и пола пациентов при ПРП.

Не установлено также достоверных корреляционных связей между уровнем протеинов клеточного цикла в экстракте ткани печени, пораженной опухолью и возрастом пациентов (Spear-

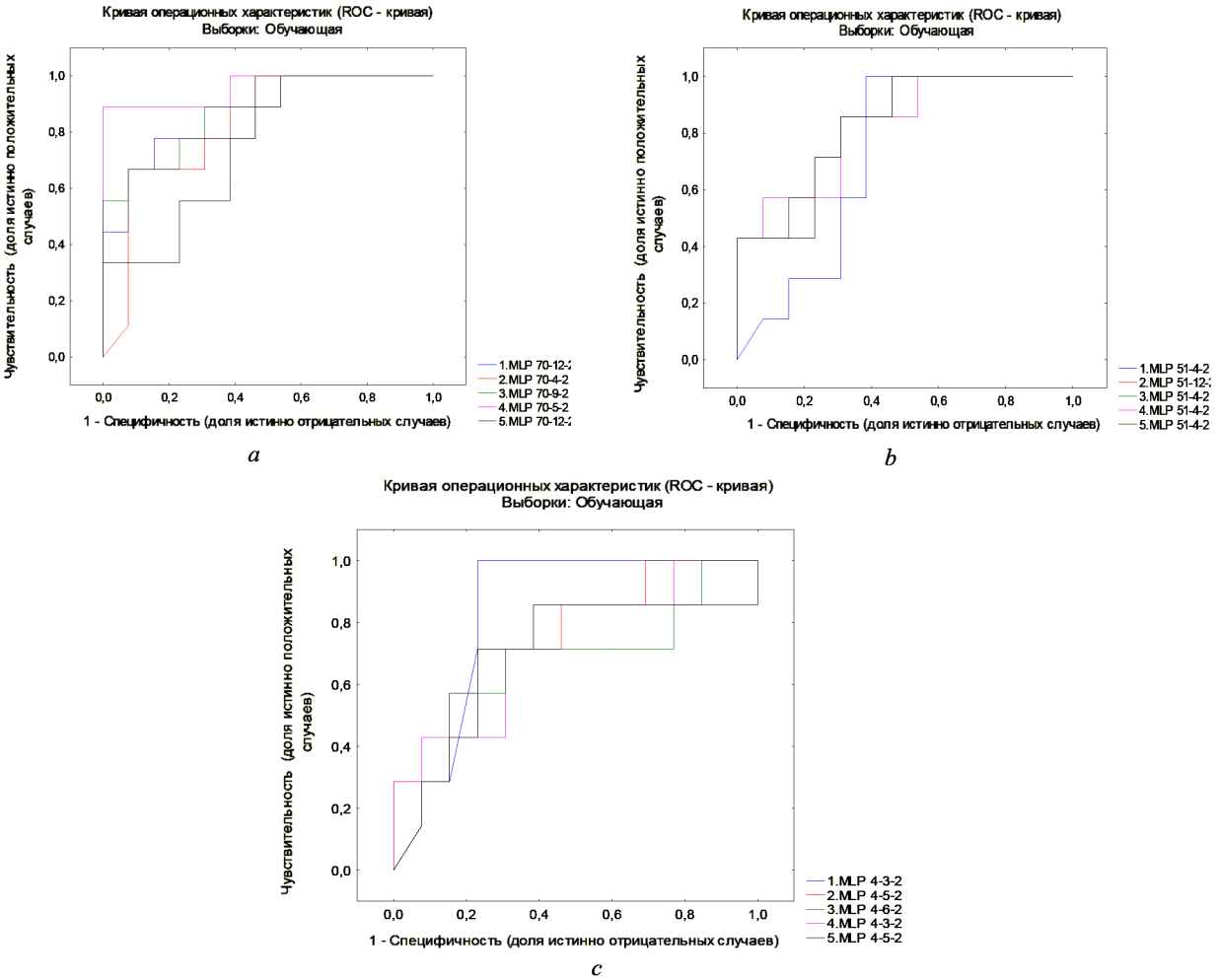


Рис. 1. ROC-кривые зависимости доли верных положительных результатов от доли ложноположительных результатов уровней протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1: *a* – при ПРП, *b* – при ХГС и ХГВ, *c* – у практически здоровых лиц

Fig. 1. ROC-curves for dependence of the proportion of true positive results on the proportion of false positive results of the levels of p53, bcl-2, pRB and NF1 proteins: *a* – primary liver cancer, *b* – chronic hepatitis C (CHC) and hepatitis B (CHB), *c* – practically healthy individuals

man $r = 0{,}120$, $p = 0{,}39$). Зависимость от возраста пациентов установлена только к протеину гена *NF1* в образцах сыворотки крови лиц при ХГВ ($r = 0{,}571$, $p = 0{,}002$). Связи между экспрессией исследуемых белков в ткани и половой принадлежностью пациентов с РП также не выявлено (Mann–Whitney *U* test – $p = 0{,}631$).

Полученные результаты позволили заключить отсутствие влияния возраста и пола пациентов с ПРП, ХГС, ХГВ на показатели протеинов клеточного цикла NF1, p53, bcl-2 и pRB, за исключением белка NF1 при ХГВ в сыворотке крови. Поскольку содержание NF1, p53, bcl-2 и pRB в исследуемых образцах ткани и сыворотки крови не коррелировало с тканью опухоли, полом и возрастом пациента, определение их в ткани опухоли, в ткани неопухолевой природы и сыворотке крови возможно у пациентов при любой форме ПРП, ХГС, ХГВ и может быть рассмотрено в качестве диагностического маркера.

Для количественной оценки информативности протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1 проведен ROC-анализ, позволявший оценить прогностическую способность исследования (рис. 1).

Коэффициент площади под кривой для p53, bcl-2, pRB и NF1 составил следующую информативность (в сравнении с 1,0):

При ПРП: pRb1 (ПРП) – 0,863, порог – 0,497 (хорошая); p53 (ПРП) – 0,657, порог – 0,326 (посредственная); bcl-2 (ПРП) – 0,824, порог – 0,497 (хорошая); NF1 (ПРП) – 0,957, порог – 0,660 (наивысшая).

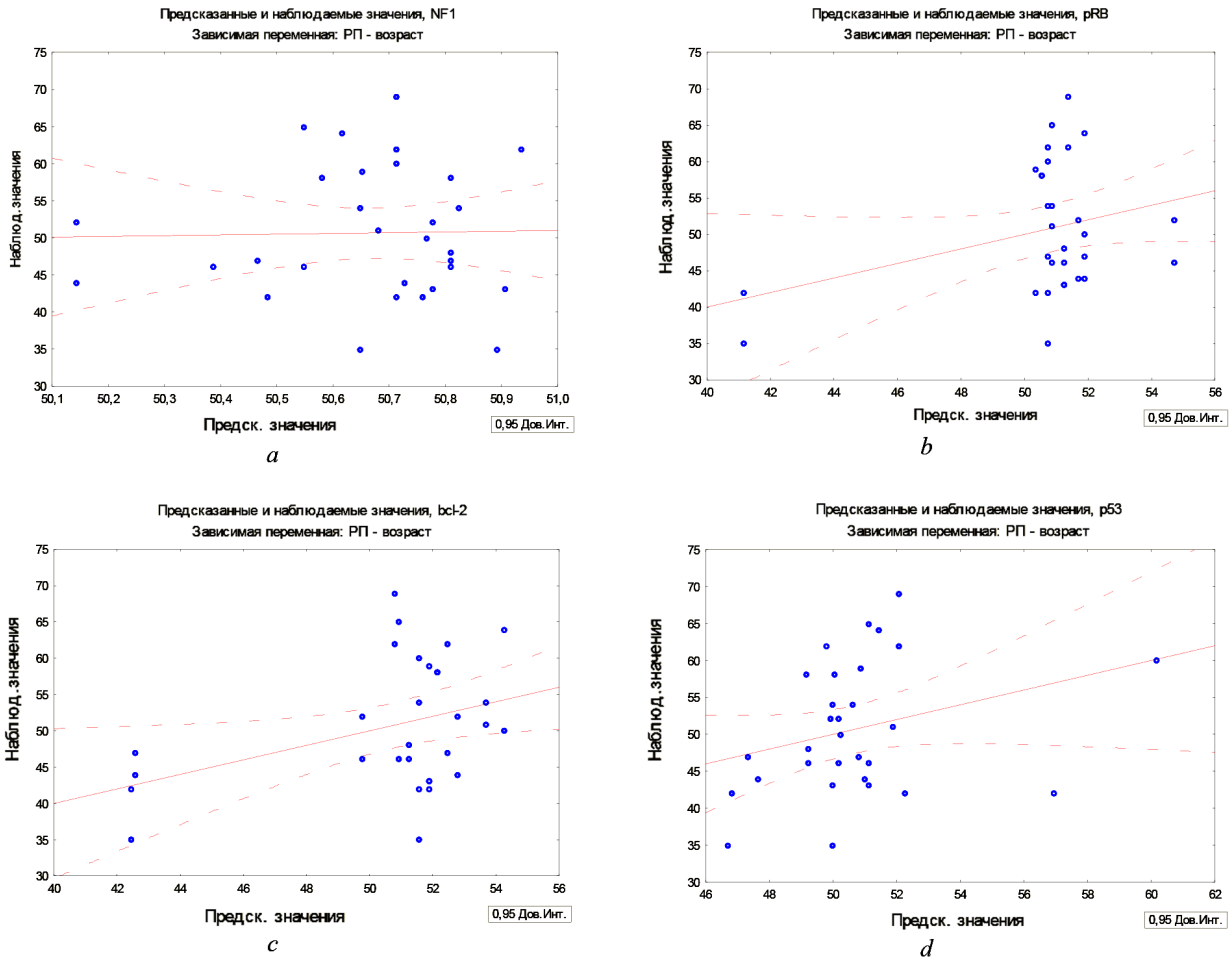


Рис. 2. Предсказанное значение концентраций протеинов клеточного цикла для лиц со злокачественными процессами ПРП в сыворотке крови: *a* – NF1, *b* – pRB, *c* – bcl-2, *d* – p53

Fig. 2. Predicted value of cell cycle protein concentrations for humans with a malignant process (primary liver cancer, PLC) in blood serum: *a* – NF1, *b* – pRB, *c* – bcl-2, *d* – p53

При ХГС: pRb1 (ВГС) – 0,852, порог – 0,396 (хорошая); p53 (ВГС) – 0,642, порог – 0,231 (посредственная); bcl-2 (ВГС) – 0,719, порог – 0,383 (удовлетворительная); NF1 (ВГС) – 0,942, порог – 0,433 (наивысшая).

При ХГВ: pRb1 (ВГВ) – 0,824, порог – 0,393 (хорошая); p53 (ВГВ) – 0,657, порог – 0,278 (посредственная); bcl-2 (ВГВ) – 0,708, порог – 0,288 (удовлетворительная); NF1 (ВГВ) – 0,835, порог – 0,250 (хорошая).

У здоровых лиц: pRb1 (здоровые) – 0,835, порог – 0,694 (хорошая); p53 (ПРП) – 0,653, порог – 0,653 (посредственная); bcl-2 (ПРП) – 0,708, порог – 0,288 (удовлетворительная); NF1 (ПРП) – 0,747, порог – 0,401 (удовлетворительная).

Оценка p53, bcl-2, pRB и NF1 как диагностических маркеров возможной опухолевой патологии и потенциального риска развития заболевания позволила установить их информативность при ПРП (NF1 – наивысшая, pRb1 и bcl-2 – хорошая), при вирусных гепатитах (NF1 при ХГС – наивысшая, NF1 при ХГВ – хорошая, pRb1 при ХГС/ХГВ – хорошая, bcl-2 при ХГС/ХГВ – удовлетворительная).

По результатам множественной регрессии протеинов клеточного цикла и с учетом возрастных групп пациентов с ПРП оценено предсказанное значение их концентрации для лиц со злокачественными процессами в печени (рис. 2).

Предсказанные значения концентраций NF1, pRB, bcl-2 и p53 для возрастной группы 50,8 года со злокачественными процессами РП в сыворотке крови составили:

для NF – 5191,165 пг/мл (B-значение = –0,000382/0; –95,0 % ИП = 2 301,556 пг/мл, +95,0 % ИП = 8 080,775 пг/мл, t = 4,7962, p = 0,00001, ИП – истинно положительные, стандартная ошибка оценки – ± 10,3 %);

для pRB – 6,215 нг/мл (B-значение = –1,97308/0; –95,0 % ИП = 3,976016 нг/мл, +95,0 % ИП = 8,447137 нг/мл, t = 9,2184, p = 0,00001, ИП – истинно положительные, стандартная ошибка оценки – ± 8,5 %);

для bcl-2 – 40,955 нг/мл (B-значение = 0,263447; –95,0 % ИП = 21,40809 нг/мл, +95,0 % ИП = 60,50323 нг/мл, t = 8,8280, p = 0,00001, ИП – истинно положительные, стандартная ошибка оценки – 8,3 %);

для p53 – 46,183 нг/мл (B-значение = 0,176197; –95,0 % ИП = 27,34699 нг/мл, +95,0 % ИП = 65,01924 нг/мл, t = 14,625, p = 0,0067, ИП – истинно положительные, стандартная ошибка оценки – 8,6 %).

Заключение. Онкогенез – сложный многоэтапный процесс с реорганизацией нормальных клеток организма, при котором рак следует рассматривать как нарушение гомеостатического баланса между ростом и гибелью клеток.

Результаты исследования подтвердили роль протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1 в качестве диагностических маркеров в процессе уточняющей диагностики ПРП.

Установленные пределы колебаний концентрации антител к p53, bcl-2, pRB и NF1 в сыворотке крови у здоровых лиц имели достоверные отличия от аналогичных показателей у пациентов с ХГС, ХГВ и ПРП (ткань, сыворотка) и образцов нативной ткани печени при отсутствии морфологически доказанного ПРП (Mann–Whitney U test – $p < 10^{-5}$).

Впервые установлены показатели антител к рецепторам протеинов p53, bcl-2, pRB и NF1 в образцах нативной (здоровой) ткани печени лиц при отсутствии морфологически доказанного ПРП, что можно расценивать как вариант «нормы» (референтные величины): p53 – 23,136 ± 8,744 нг/мл; bcl-2 – 34,265 ± 9,930 нг/мл; pRb1 – 4,121 ± 0,745 нг/мл; NF1 – 4204,194 ± 743,706 пг/мл.

Между протеинами клеточного цикла и механизмами апоптоза клетки при ХГВ и ПРП как в образцах сыворотки крови, так и в образцах экстрактов ткани опухоли прослеживается четкая корреляционная связь.

Мутации генов *BRCA 1/2* и *hMSH2* у лиц с ПРП в крови и в образцах тканей, составившие 6,13 и 0,85 % в образцах крови (p = 0,004), позволяют предположить наследственную природу опухоли.

Наличие мутаций в генах *BRCA 1/2* у женщин следует рассматривать как риск развития ПРП, на что указывает их частота при ПРП, коррелирующая с изменениями в экзонах 6 и 12 гена

hMSH2. Наличие мутаций гена *hMSH2* (экзоны 6, 12) при ПРП следует рассматривать как риск развития ПРП, а ассоциации мутаций генов с вирусами позволяют заключить, что высокий онкогенный потенциал несут такие вирусы, как ВПЧ, ЦМВ, ВГП 1/2, HHV6, ВГВ и ВГС.

Удельный вес микст-инфекции (ДНК/РНК двух и более вирусов) при ПРП составил 9,1 %. На фоне носительства ЦМВ в организме лиц с ХГС возрастают уровни экспрессии bcl-2 и «хранителей клеточного цикла» NF1 ($p = 0{,}001$). Аналогичные изменения в клеточном цикле происходят и при наличии ДНК ВГВ, что способствует увеличению экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста pRb1 ($p = 0{,}003$). Вирус Эпштейна–Барр и HHV6 показали положительную корреляционную связь, свидетельствующую об активности регулирующего клеточный цикл белка p53 у лиц с ПРП ($p = 0{,}003$) и NF1 у лиц с ВГС ($p = 0{,}002$) и ВГС ($p = 0{,}001$).

Интерес вызывают гены *BRCA2* (экзон 11) и *hMSH2* (экзоны 4, 7, 16), мутации в которых способствуют росту концентрации p53 и NF1 в группе здоровых лиц ($p = 0{,}002$), и ген *hMSH2* (экзоны 1, 7), когда при отсутствии мутаций в экзонах гена у лиц с ХГС отмечается рост экспрессии NF1 и bcl-2 ($p = 0{,}001$ и $p = 0{,}0019$ соответственно).

Установленные зависимости позволяют заключить следующее: возраст (Median test, $p = 0{,}28$) и пол (Median test, $p = 0{,}33$) при ПРП, ХГС, ХГВ не влияют на показатели NF1, p53, bcl-2 и pRB, за исключением белка NF1 при ХГВ в сыворотке крови. Определение их концентраций в ткани опухоли может использоваться при выполнении диагностических исследований и для контроля полноты объема резекции опухоли при проведении хирургических вмешательств.

Определение p53, bcl-2, pRB и NF1 как диагностических маркеров возможной опухолевой патологии и потенциального риска развития заболевания позволило установить их информативность при ПРП (NF1 – наивысшая, pRb1 и bcl-2 – хорошая), при вирусных гепатитах (NF1 при ХГС – наивысшая, NF1 при ХГВ – хорошая, pRb1 при ХГС/ХГВ – хорошая, bcl-2 при ХГС/ХГВ – удовлетворительная).

Ассоциации протеинов клеточного цикла, степень их влияния на регулирующую функцию генов и повреждение ДНК с учетом присутствующей в геноме ДНК/РНК вирусов и мутаций (*BRCA 1/2*, *hMSH2*) позволяют предположить различную степень онкогенной опасности оцененных вирусов: высокого онкогенного риска – ВГС (при наличии мутации гена *hMSH2*); ЦМВ (при наличии мутации гена *BRCA1*), ВГВ (при наличии мутации гена *BRCA1*), *ВГП 1/2* и ПВЧ у женщин (при наличии мутации генов *BRCA 1/2*), среднего онкогенного риска – ВЭБ (при носительстве ВГВ/ВГС), HHV6 (при носительстве вируса гепатита С).

При наличии ПРП показатели концентраций p53, bcl-2, pRB и NF1 в сыворотке крови, превышающие предсказанные концентрации 5191,165 пг/мл для NF1, 6,215 нг/мл pRB, 40,955 нг/мл для bcl-2 и 46,183 нг/мл для p53 для возрастной группы 50,8 года, свидетельствуют о риске развития/наличия опухолевого процесса, при котором клинические методы обследования не выявляют признаков новообразования.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray [et al.] // CA Cancer J. Clin. – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

2. Кузнецов, О. Е. Вирус-ассоциированный гепатоцеллюлярный рак печени / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // Гепатология и гастроэнтерология. – 2021. – Т. 5, № 1. – С. 17–24.

3. Mucin expression in liver tumors / O. E. Kuznetsov [et al.] // Int. J. Health Sci. – 2022. – Vol. 6, N S5. – P. 12000–12012. https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS5.11810

4. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review / R. J. Mitchell [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 2002. – Vol. 156, N 10. – P. 885–902. https://doi.org/10.1093/aje/kwf139

5. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cance / T. Walsh [et al.] // JAMA. – 2006. – Vol. 295, N 12. – P. 1379–1388. https://doi.org/10.1001/jama.295.12.1379

6. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC / M. Weischer [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25, N 1. – P. 57–63. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5160

7. Jensen, O. N. Interpreting the protein language using proteomics / O. N. Jensen // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – Vol. 7, N 6. – P. 391–403. https://doi.org/10.1038/nrm1939

8. Vaux, D. L. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells / D. L. Vaux, S. Cory, J. M. Adams // Nature. – 1988. – Vol. 335, N 6189. – P. 440–442. https://doi.org/10.1038/335440a0

9. Bcl-2 как прогностический фактор в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы / И. А. Павленко [и др.] // Архив патологии. – 2012. – Т. 74, № 5. – С. 36–40.

10. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction / H. Ishida [et al.] // Cancer. – 1997. – Vol. 80, N 6. – P. 1034–1045.

11. Взаимосвязь маркеров апоптоза (P53, BCL-2, BAX) с клинико-морфологическими параметрами и выживаемостью при немелкоклеточном раке легкого / Д. С. Кобяков [и др.] // Сиб. онкол. журн. – 2014. – № 5. – С. 10–16.

12. Phenotype-genotype correlation in children with neuroibromatosis Type 1 / C. Barrea [et al.] // Neuropediatrics. – 2018. – Vol. 49, N 3. – P. 180–184. https://doi.org/10.1055/s-0037-1620239

13. The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour cell survival / N. K. Clemo [et al.] // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – Vol. 33, pt. 4. – P. 676–678. https://doi.org/10.1042/BST0330676

14. pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia / K. Simin [et al.] // PLoS Biol. – 2006. – Vol. 2, N 2. – Art. E22. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020022

15. Classon, M. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer / M. Classon, E. Harlow // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – Vol. 2, N 12. – P. 910–917. https://doi.org/10.1038/nrc950

16. Горчакова, О. В. Метод выявления мутаций в гене hMLH1 при опухолях кишечника / О. В. Горчакова, О. Е. Кузнецов // Мед. новости. – 2019. – № 2. – С. 76–80.

17. Сравнение компьютерных программ для проведения описательной статистики и ROC-анализа / Ю. В. Кореновский [и др.] // Медицина в Кузбассе. – 2017. – Т. 15, № 3. – С. 40–44.

18. Кузнецов, О. Е. Ассоциации генетических вариантов генов и вирусной ДНК/РНК при раке печени и толстого кишечника / О. Е. Кузнецов, В. М. Цыркунов // Вестн. ВГМУ. – 2022. – Т. 21, № 6. – С. 38–46.

References

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 2018, vol. 68, no. 6, pp. 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

2. Kuznetsov O. E., Tsyrkunov V. M. Virus-associated hepatocellular carcinoma of the liver. *Gepatologiya i gastroenterologiya* [Hepatology and gastroenterology], 2021, vol. 5, no. 1, pp. 17–24 (in Russian).

3. Kuznetsov O. E., Tsyrkunov V. M., Ali Adeeb Hussein A., Kerimova S. Sh. Mucin expression in liver tumors. *International Journal of Health Sciences*, 2022, vol. 6, no. S5, pp. 12000–12012. https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS5.11810

4. Mitchell R. J., Farrington S. M., Dunlop M. G., Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2002, vol. 156, no. 10, pp. 885–902. https://doi.org/10.1093/aje/kwf139

5. Walsh T., Casadei S., Coats K. H., Swisher E., Stray S. M., Higgins J. [et al.]. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cance. *Journal of the American Medical Association*, 2006, vol. 295, no. 12, pp. 1379–1388. https://doi.org/10.1001/jama.295.12.1379

6. Weischer M., Bojesen S. E., Tybjaerg-Hansen A., Axelsson C. K., Nordestgaard B. G. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC. *Journal of Clinical Oncology*, 2007, vol. 25, no. 1, pp. 57–63. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5160

7. Jensen O. N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, vol. 7, no. 6, pp. 391–403. https://doi.org/10.1038/nrm1939

8. Vaux D. L., Cory S., Adams J. M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988, vol. 335, no. 6189, pp. 440–442. https://doi.org/10.1038/335440a0

9. Pavlenko I. A., Povilaitite P. E., Gorelik M. Z., Petrov A. V. Bcl-2 as a prognostic factor in various molecular genetic subtypes of breast cancer. *Arkhiv patologii* [Pathology archive], 2012, vol. 74, no. 5, pp. 36–40 (in Russian).

10. Ishida H., Irie K., Itoh T., Furukawa T., Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer*, 1997, vol. 80, no. 6, pp. 1034–1045.

11. Kobyakov D. S., Lazarev A. F., Lushnikova E. L., Nepomnyashchikh L. M. Correlation of apoptosis markers (P53, VCL-2, BAH) with clinic-morphological parameters and survival in non-small cell lung cancer. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal* [Siberian journal of oncology], 2014, no. 5, pp. 10–16 (in Russian).

12. Barrea C., Vaessen S., Bulk S., Harvengt J., Misson J.-P. Phenotype-genotype correlation in children with neuroibromatosis. Type 1. *Neuropediatrics*, 2018, vol. 49, no. 3, pp. 180–184. https://doi.org/10.1055/s-0037-1620239

13. Clemo N. K., Arhel N. J., Barnes J. D., Baker J., Moorghen M., Packham G. K., Paraskeva C., Williams A. C. The role of the retinoblastoma protein (Rb) in the nuclear localization of BAG-1: implications for colorectal tumour cell survival. *Biochemical Society Transactions*, 2005, vol. 33, pt. 4, pp. 676–678. https://doi.org/10.1042/BST0330676

14. Simin K., Wu H., Lu L., Pinkel D., Albertson D., Cardiff R. D., Van Dyke T. pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. *PLoS Biology*, 2006, vol. 2, no. 2, art. E22. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020022

15. Classon M., Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 2, no. 12, pp. 910–917. https://doi.org/10.1038/nrc950

16. Gorchakova O. V., Kuznetsov O. E. Method for detecting mutations in the nMLN1 gene in intestinal tumors. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2019, no. 2, pp. 76–80 (in Russian).

17. Korenovskii Yu. V., Kudinov A. V., Suzopov E. V., Popovtseva A. V. Comparison of computer programs for descriptive statistics and ROC analysis. *Meditsina v Kuzbasse* [Medicine in Kuzbass], 2017, vol. 15, no. 3, pp. 40–44 (in Russian).

18. Kuznetsov O. E., Tsyrkunov V. M. Associations of genetic variants of genes and viral DNA/RNA in liver and colon cancer. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of Vitebsk State Medical University], 2022, vol. 21, no. 6, pp. 38–46 (in Russian).

Информация об авторе

Кузнецов Олег Евгеньевич – канд. биол. наук, доцент, директор. Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси (пл. Антония Тызенгауза, 7, 230023, г. Гродно, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-1348-8688. E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru

Information about the author

Aleh E. Kuzniatsou – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Director. Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds of the National Academy of Sciences of Belarus (7, Anthony Tyzengauz Sq., 230023, Grodno, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-1348-8688. E-mail: olegkuznetsov@inbox.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.5-004
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-140-146

Поступила в редакцию 29.03.2022
Received 29.03.2022

А. С. Трофименко, О. И. Емельянова, О. А. Русанова

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского, Волгоград, Российская Федерация

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К I, II, III ТИПАМ КОЛЛАГЕНА И ЭЛАСТИНУ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

Аннотация. Цель работы – изучение клинико-иммунологического значения определения уровня антител к I, II, III типам коллагена и эластину у больных системной склеродермией с использованием иммобилизированных гранулированных антигенных препаратов (ИГАП).

В группу системной склеродермии был включен 51 пациент с верифицированным диагнозом и различной активностью заболевания, контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц. Лабораторные параметры оценивали при поступлении и при выписке из стационара. Антитела к I, II, III типам коллагена и эластину определяли в сыворотке крови пациентов методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием ИГАП.

У больных системной склеродермией наблюдалось повышение уровня аутоантител к I, II, III типам коллагена и эластину уже при I степени активности заболевания по сравнению с донорами. Обнаружена статистически значимая зависимость уровня этих антител от активности и характера течения системной склеродермии. Выявлено также увеличение количества антител к I, II, III типам коллагена и эластину у больных системной склеродермией с поражением кожи, легких, сердца и почек.

Определение антител к I, II, III типам коллагена и эластину имеет индикаторное значение, являясь показателем активности, характера течения, эффективности иммуносупрессивной терапии и клинического варианта системной склеродермии, а также является полезным для дальнейших исследований этиопатогенеза данного заболевания.

Ключевые слова: коллаген, эластин, системная склеродермия, антитела, магнитосорбенты

Для цитирования: Трофименко, А. С. Клинико-иммунологическое значение определения антител к I, II, III типам коллагена и эластину при системной склеродермии / А. С. Трофименко, О. И. Емельянова, О. А. Русанова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 140–146. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-140-146

Andrey S. Trofimenko, Olga I. Emelyanova, Olga A. Rusanova

Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A. B. Zborovsky, Volgograd, Russian Federation

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL SIGNIFICANCE OF QUANTIFICATION OF ANTIBOFIES TO TYPE I, II, III COLLAGEN AND ELASTIN IN SYSTEMIC SCLERODERMA

Abstract. The aim of the work was to study clinical and immunological relevance of quantification of antibodies to type I, II, III collagen and elastin in systemic scleroderma.

51 systemic scleroderma patients with verified diagnosis and different disease activity were included in the study. 30 healthy volunteers were included in the control group. The laboratory markers were assessed both on admission and on discharge. Antibodies to serum type I, II, or III collagen, and elastin were measured using the ELISA test with antigen immobilized on the magnetic beads.

Increased concentrations of antibodies to serum type I, II, or III collagen and elastin were found in systemic scleroderma with minimal disease activity. Statistical interrelations between antibody levels and disease activities and course types were also revealed. Skin, kidney, lung, and heart involvement in systemic scleroderma patients were associated with the more pronounced levels of antibodies to collagen compared to the absence of these conditions.

Measurement of antibodies to serum type I, II, or III collagen and elastin in systemic scleroderma using antigen immobilized on magnetic beads is a candidate biomarker for better diagnosis and assessment of disease activity, course type, clinical pattern, treatment control, as well as useful tool for research of systemic scleroderma pathogenesis.

Keywords: I, II, III type collagen, elastin, systemic scleroderma, antibodies, magnetic carriers

© Трофименко А. С., Емельянова О. И., Русанова О. А., 2023

For citation: Trofimenko A. S., Emelyanova O. I., Rusanova O. A. Clinical and immunological significance of quantification of antibodies to type I, II, III collagen and elastin in systemic scleroderma. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 140–146 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-140-146

Введение. Системная склеродермия (ССД) представляет собой хроническое полисиндромное заболевание с неуклонно прогрессирующим течением, характерными склеротическими изменениями кожи, опорно-двигательного аппарата, внутренних органов, каскадными нарушениями микроциркуляции и вазоспастическими нарушениями по типу синдрома Рейно.

Согласно современным представлениям, важным звеном патогенеза ССД является развитие аутоиммунного ответа на антигены нуклеиновой, липидной и белковой природы [1, 2]. Антителообразование к протеинам экстрацеллюлярного матрикса при данном заболевании представляет особый интерес ввиду того, что ССД – классическая модель генерализованного склероза. Было предпринято несколько попыток изучения механизмов влияния антител к элементам соединительной ткани на процессы фиброзообразования при ССД [3, 4]. Большой интерес представляют результаты исследований коллагенов I, II, III типов и эластина в патогенезе и диагностике ССД [5, 6]. С аутоиммунными реакциями на коллаген I, II, III типов и эластин могут быть связаны начальные проявления ССД, такие как поражение кожи, суставов, синдром Рейно, и вовлечение в патологический процесс жизненно важных органов – легких, сердца, почек [7, 8].

Свойственные болезни индуративные изменения кожи и висцерофиброзы обусловлены значительным нарушением биосинтеза коллагена. Появление форм коллагена с аутоантигенной активностью, каскад аутоиммунных нарушений с повреждением внутренних органов и систем, а также микроциркуляторного русла являются элементами генерализации процесса при ССД. Структурным изменениям в первую очередь подвергаются наиболее распространенные в организме I, II и III типы коллагена. Аутоиммунные реакции на эти типы коллагена играют важную роль в прогрессировании склеродермического процесса [9]. Имеющиеся в литературе данные об исследовании антител к I, II, III типам коллагена и эластину при ССД единичны и не содержат анализа изучаемых антител в зависимости от особенностей течения и клинической формы заболевания [10]. В связи с этим изучение клинико-иммунологических аспектов определения уровня антител к I, II, III типам коллагена и эластину у больных ССД является перспективным направлением исследования патогенеза данного заболевания.

Цель исследования – изучение клинико-иммунологического значения определения уровня антител к I, II, III типам коллагена и эластину у больных системной склеродермией с использованием иммобилизированных гранулированных антигенных препаратов.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Международной медицинской ассоциации [11]. На проведение исследования было получено разрешение комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А. Б. Зборовского» (протокол № 1 от 11.09.2017 г.). В исследование были включены 30 практически здоровых лиц и 51 пациент с верифицированной ССД, госпитализированный в отделение ревматологии ГБУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда. Верификация диагноза осуществлялась по критериям Н. Г. Гусевой [2]. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на обследование. Оценку клинических и иммунологических параметров производили при поступлении в стационар и перед выпиской. Активность ССД оценивали по G. Vallentini с соавт. [12]. Течение ССД определяли по классификации Н. Г. Гусевой [2].

Иммунологические исследования. Антитела (АТ) к I, II, III типам коллагена и эластину определяли в сыворотке крови больных ССД иммуноферментным методом в модификации И. П. Гонтаря [13]. В качестве антигена для иммобилизации на гранулированных антигенных препаратах (ИГАП) использовали коммерческие препараты эластина легкого человека, коллаген I, II, III типов (Sigma-Aldrich, США).

Статистический анализ. Обработку данных проводили с применением программного пакета Statistica 10.0 для Windows (США). Результаты выражали как среднее арифметическое (M) ± стандартная ошибка (m). Полученные значения выражали в единицах оптической плотности (ед. опт. пл.) и считали положительными при превышении величин экстинкции, определенных для здоровых лиц, более чем на три средних квадратических отклонения. Статистически значимыми считали показатели при $p < 0,05$.

Характеристика групп. Все больные ССД были женского пола, их возраст составлял от 22 до 72 лет (средний возраст – 44,1 ± 15,4 года). Среди больных ССД 18 (35,3 %) человек имели I степень активности, 20 (39,2 %) – II, 13 (25,5 %) – III степень. При оценке течения ССД хроническое течение было выявлено у 34 (66,7 %) пациентов, подострое – у 17 (33,3 %) человек. Поражение кожи встречалось чаще всего – у 38 (58,8 %) пациентов, так как является ведущим диагностическим признаком заболевания. Суставно-мышечные поражения встречались у 20 (35,3 %) пациентов и были представлены артритами. Поражение легких в виде базального пневмофиброза наблюдалось у 20 (35,3 %) больных ССД. Поражение сердца также нередко встречалось при ССД – у 17 (33,3 %) пациентов, при этом ведущим типом поражения являлся склеродермический кардиосклероз. Хроническая склеродермическая нефропатия была выявлена у 15 (29,3 %) человек (креатинин крови ≥ 180 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации ≤ 60 мл/мин). Прочие висцеральные проявления в группе ССД встречались существенно реже.

Результаты и их обсуждение. При анализе группы больных ССД в целом на наличие специфических АТ к коллагену I, II, III типов было выявлено, что уже при наличии I (низкой) степени активности заболевания происходит повышение концентрации данных АТ по сравнению с таковой в контрольной группе. При умеренной и высокой активности ССД содержание АТ к коллагену всех типов было выше, чем у лиц с низкой активностью заболевания (табл. 1). В процессе лечения отмечалась тенденция к снижению уровня АТ к коллагену I, II, III типов у всех больных ССД независимо от ее степени активности, для II типа коллагена содержание специфических АТ снижалось практически до верхней границы нормы.

Т а б л и ц а 1. **Уровень АТ к коллагену I, II, III типов и эластину у больных ССД в зависимости от активности заболевания (M ± m)**

T a b l e 1. **Level of antibodies to type I, II, III collagen and elastin in patients with SJS depending on the disease activity (M ± m)**

Показатель	Контрольная группа (n = 30)	Степень активности заболевания					
		I (n = 18)		II (n = 20)		III (n = 13)	
		А	Б	А	Б	А	Б
Концентрация АТ, ед. опт. пл.:							
к коллагену I типа	0,050 ± 0,005	0,223 ± 0,041*	0,136 ± 0,031	0,434 ± 0,054*	0,301 ± 0,027	0,614 ± 0,071*	0,321 ± 0,043
к коллагену II типа	0,052 ± 0,004	0,084 ± 0,006	0,063 ± 0,003	0,128 ± 0,008**	0,069 ± 0,004	0,166 ± 0,014**	0,078 ± 0,006
к коллагену III типа	0,049 ± 0,005	0,194 ± 0,037#	0,116 ± 0,027	0,232 ± 0,046#	0,134 ± 0,031	0,358 ± 0,091#	0,234 ± 0,054
к эластину	0,053 ± 0,004	0,098 ± 0,008	0,086 ± 0,006	0,136 ± 0,006^	0,128 ± 0,004	0,152 ± 0,003^	0,132 ± 0,006

П р и м е ч а н и е. А – при поступлении, Б – при выписке; *, **, #, ^ – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Т а б л и ц а 2. **Взаимосвязь между активностью заболевания и частотой выявления антител к I, II, III типам коллагена и эластину**

T a b l e 2. **Relationship between the activity and the frequency of detection of antibodies to type I, II, III collagen and elastin**

Степень активности заболевания	Общее число наблюдений	Частота выявления антител			
		к коллагену I типа	к коллагену II типа	к коллагену III типа	к эластину
I	18	7 (38,8 %)	8 (44,4 %)	8 (44,4 %)	7 (38,8 %)
II	20	8 (40 %)	10 (49,9 %)	12 (60,0 %)	9 (45,0 %)
III	13	9 (69,1 %)	10 (76,9 %)	10 (76,9 %)	10 (76,9 %)

Т а б л и ц а 3. **Взаимосвязь между характером течения ССД и уровнем антител к коллагену I, II, III типов и эластину**

T a b l e 3. **Relationship between the nature of the SJS course and the level of antibodies to type I, II, III collagen and elastin**

Характер течения ССД	Общее число наблюдений	Время обследования	Концентрация АТ (M ± m)			
			к коллагену I типа	к коллагену II типа	к коллагену III типа	к эластину
Хроническое	34	А	0,278 ± 0,034	0,096 ± 0,003	0,168 ± 0,022	0,116 ± 0,008
		Б	0,186 ± 0,023	0,062 ± 0,002	0,121 ± 0,021	0,109 ± 0,006
Подострое	17	А	0,568 ± 0,033	0,134 ± 0,012	0,312 ± 0,052	0,136 ± 0,006
		Б	0,234 ± 0,046	0,078 ± 0,003	0,204 ± 0,037	0,121 ± 0,005

П р и м е ч а н и е. А – до лечения, Б – после лечения.

Т а б л и ц а 4. **Взаимосвязь между характером течения ССД и частотой выявления антител к I, II, III типам коллагена и эластину**

T a b l e 4. **Relationship between the nature of the course and the frequency of detection of antibodies to type I, II, III collagen and elastin**

Характер течения ССД	Общее число наблюдений	Частота выявления антител			
		к коллагену I типа	к коллагену II типа	к коллагену III типа	к эластину
Хроническое	34 (66,6 %)	16 (47 %)	18 (52,9 %)	15 (44,1 %)	16 (47,0 %)
Подострое	17 (33,3 %)	10 (58,8 %)	12 (70,5 %)	12 (64,6 %)	11 (64,8 %)

При анализе взаимосвязи между активностью ССД и частотой выявления антител к коллагену I, II, III типов и эластину (табл. 2) прослеживалась слабая тенденция к увеличению распространенности всех изучаемых антител, однако статистически значимой ассоциации выявлено не было.

Изучение содержания антител к коллагену при различных вариантах течения ССД (табл. 3) показало нарастание их количества с увеличением скорости прогрессирования склеродермического процесса, но эти различия также не были статистически значимыми. При анализе взаимосвязи между течением ССД и частотой выявления антител к коллагену I, II, III типов и эластину (табл. 4) статистически значимой ассоциации также выявлено не было. У больных ССД с хроническим течением при поступлении в стационар наблюдалось повышение среднего уровня антител к эластину по сравнению с контрольной группой. В процессе лечения отмечалась тенденция к снижению всех специфических антител. У пациентов с подострым течением заболевания при поступлении в стационар уровень специфических антител значительно превосходил показатели лиц контрольной группы ($p < 0{,}001$) и больных с хроническим вариантом течения ССД ($p < 0{,}05$ для всех типов антител) (см. табл. 3). Среди обследуемых пациентов случаев острого течения не было. Таким образом, согласно результатам анализа взаимосвязи изучаемых показателей с активностью и течением ССД, уровни и частоты выявления АТ к коллагену I, II, III типов и эластину у больных ССД могут служить в качестве маркера хронического аутоиммунного воспаления соединительной ткани.

Проанализирована взаимосвязь разных клинических проявлений у больных ССД с наличием антител к коллагену I, II, III типов и эластину (табл. 5). Для I типа коллагена статистически значимыми являются поражения кожи, легких, сердца и почек, для II типа – суставов и легких, для III типа – легких и сердца. Такое распределение, очевидно, связано с тем, что I тип коллагена в большом количестве встречается в коже, связках, сухожилиях, костной и мышечной ткани, в альвеолах легких, почках, сердце и печени. Основным коллагеном гиалиновых хрящей (80–90 %) является II тип коллагена, поэтому для II типа характерно поражение суставов. III тип коллагена содержится в тех же тканях, что и I тип, поэтому для него характерно поражение легких и сердца. Статистически значимой связи между поражением органов и частотой выявления специфических антител не обнаружено (табл. 6).

Т а б л и ц а 5. **Уровень антител к коллагену I, II, III типов и эластину в зависимости от наличия клинико-иммунологических проявлений у больных ССД**

T a b l e 5. **Level of antibodies to type I, II, III collagen and elastin depending on the presence of clinical and immunological manifestations in patients with SJS**

Пораженный орган	Общее число наблюдений	Время обследования	Концентрация АТ (M ± m)			
			к коллагену I типа	к коллагену II типа	к коллагену III типа	к эластину
Кожа	51	А	0,384 ± 0,072*	0,078 ± 0,006	0,168 ± 0,022	0,126 ± 0,047
		Б	0,216 ± 0,031*	0,061 ± 0,002	0,118 ± 0,033	0,086 ± 0,032
Суставы	18	А	0,218 ± 0,063#	0,161 ± 0,021	0,264 ± 0,073	0,158 ± 0,064
		Б	0,156 ± 0,004#	0,068 ± 0,003	0,184 ± 0,008	0,114 ± 0,056
Легкие	20	А	0,568 ± 0,074##	0,086 ± 0.006	0,308 ± 0,043**	0,152 ± 0,043
		Б	0,364 ± 0,033##	0,061 ± 0,004	0,189 ± 0,034**	0,116 ± 0,062
Сердце	17	А	0,246 ± 0,046	0,096 ± 0,032	0,268 ± 0,004&	0,126 ± 0,071
		Б	0,174 ± 0,033	0,068 ± 0,006	0,176 ± 0,006&	0,112 ± 0,075
Почки	15	А	0,321 ± 0,052***	0,121 ± 0,042	0,462 ± 0,121	0,124 ± 0,054
		Б	0,206 ± 0,033***	0,076 ± 0,003	0,389 ± 0,033	0,109 ± 0,062
Другие поражения	10	А	0,124 ± 0,074	0,112 ± 0,007	0,128 ± 0,006	0,123 ± 0,004^
		Б	0,106 ± 0,006	0,102 ± 0,006	0,102 ± 0,004	0,103 ± 0,004^

П р и м е ч а н и е. А – до лечения, Б – после лечения; *, #, ^, & – $p < 0{,}001$, ** – $p = 0{,}018$, ## – $p = 0{,}008$.

Т а б л и ц а 6. **Взаимосвязь спектра поражения отдельных органов и частотой выявления антител к I, II, III типам коллагена и эластину**

T a b l e 6. **Relationship between the spectrum of damage to individual organs and the frequency of detection of antibodies to type I, II, III collagen and elastin**

Пораженный орган	Число наблюдений	Частота встречаемости антител			
		к коллагену I типа	к коллагену II типа	к коллагену III типа	к эластину
Кожа	51	28 (54,8 %)	25 (49 %)	27 (52,9 %)	31 (60,7 %)
Суставы	18	12 (66,6 %)	12 (66,6 %)	11 (61,1 %)	10 (55,5 %)
Легкие	20	9 (45,0 %)	10 (100,0 %)	9 (45,0 %)	8 (40,0 %)
Сердце	17	12 (75,8 %)	9 (52,9 %)	10 (58,8 %)	8 (47,1 %)
Почки	20	13 (65,0 %)	10 (50,0 %)	11 (55,0 %)	10 (50,0 %)
Другие поражения	10	2 (20,0 %)	2 (20,0 %)	3 (30,0 %)	3 (30,0 %)

Заключение. Таким образом, определение антител к коллагену I, II, III типов и эластину имеет индикаторное значение, отражая активность, характер течения и спектр клинических проявлений ССД. Использование ИГАП позволит улучшить диагностику не только минимальных проявлений активности патологического процесса, но и разнообразных висцеральных проявлений этого заболевания, расширить имеющиеся представления о патогенезе склеродермического процесса и наметить пути дальнейших научных исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Гусева, Н. Г. Системная склеродермия – мультидисциплинарная проблема / Н. Г. Гусева // Науч.-практ. ревматология. – 2011. – Т. 49, № 2. – С. 10–14.

2. Сигидин Я. А. Диффузные болезни соединительной ткани / Я. А. Сигидин, Н. Г. Гусева, М. М. Иванова. – М. : Медицина, 2004. – 640 с.

3. Потекаев, Н. Н. Патогенез склеродермии: современные представления / Н. Н. Потекаев, В. В. Вавилов // Клин. дерматология и венерология. – 2012. – Т. 10, № 5. – С. 8–15.

4. Роль аутоантител в развитии склеродермии / Н. Н. Потекаев [и др.] // Клин. дерматология и венерология. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 4–12.

5. Varga, J. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder / J. Varga, D. Abraham // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117, N 3. – P. 557–567. https://doi.org/10.1172/JCI31139

6. Cellular players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis / P. Cipriani [et al.]. // Autoimmun Rev. – 2011. – Vol. 10, N 10. – P. 41–47. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.04.016

7. Корреляция уровня антител к эластину и эластазе у больных системной склеродермией и системной красной волчанкой с патологией сердечно-сосудистой системы / И. П. Гонтарь [и др.] // Вестн. Волгоград. ГМУ. – 2019. – № 3. – С. 27–30.

8. Последовательность вовлечения белковых компонентов соединительной ткани в аутоиммунное воспаление при склеродермическом процессе / И. П. Гонтарь [и др.] // Соврем. проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. – Ст. 114.

9. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis / C. Chizzolini [et al.] // Autoimmun Rev. – 2011. – Vol. 10, N 5. – P. 276–281. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.016

10. Robert, L. Les macromolecules de la matrice extracellulare / L. Robert, J. Labat-Robert // Ann. Biol. Clin. – 1986. – Vol. 44, N 2. – P. 145–146.

11. Weijer, C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics / C. Weijer // CMAJ. – 1997. – Vol. 156, N 8. – P. 1153–1160.

12. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria / G. Vallentini [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62, N 9. – P. 901–904. https://doi.org/10.1136/ard.62.9.901

13. Гонтарь И. П., Зборовский А. Б. Левкин С. В., Сычева Г. Ф. Способ получения магнитных полиакриламидных гранул: патент на изобр. РФ № 1582657. – 1993.

References

1. Guseva N. G. Systemic scleroderma – a multidisciplinary problem. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* [Scientific and practical rheumatology], 2011, vol. 49, no. 2, pp. 10–14 (in Russian).

2. Sigidin Ya. A., Guseva N. G., Ivanova M. M. *Diffuse diseases of connective tissue*. Moscow, Meditsina Publ., 2004. 640 p. (in Russian).

3. Potekaev N. N., Vavilov V. V. Pathogenesis of scleroderma: current ideas. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* [Clinical dermatology and venereology], 2012, vol. 10, no. 5, pp. 8–15 (in Russian).

4. Potekaev N. N., Korsunskaya I. M., Guseva S. D., Nevozinskaya Z. A. The role of autoantibodies in the development of scleroderma. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* [Clinical dermatology and venereology], 2014, vol. 12, no. 1, pp. 4–12 (in Russian).

5. Varga J., Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *Journal of Clinical Investigation*, 2007, vol. 117, no. 3, pp. 557–567. https://doi.org/10.1172/JCI31139

6. Cipriani P., Marrelli A., Liakonli V., Di Benedetto P., Giacomelli R. Celluar players in angiogenesis during the course of systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 2011, vol. 10, no. 10, pp. 641–647. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.04.016

7. Gontar' I. P., Rusanova O. A., Emel'yanova O. I., Krasil'nikov A. N. Correlation of the level of antibodies to elastin and elastase in patients with systemic scleroderma and systemic lupus erythematosus with pathology of the cardiovascular system. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*, 2019, no. 3, pp. 27–30 (in Russian).

8. Gontar' I. P., Emel'yanova O. I., Rusanova O. A., Emel'yanov N. I., Krasil'nikov A. N., Zborovskaya I. A. The sequence of involvement of protein components of connective tissue in autoimmune inflammation in the scleroderma process. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2019, no. 5, art. 114 (in Russian).

9. Chizzolini C., Brembilla N. C., Montanari E., Truchetet M.-E. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 2011, vol. 10, pp. 276–281. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.09.016

10. Robert L., Labat-Robert J. Les macromolecules de la matrice extracellulare. *Annales de Biologie Clinique*, 1986, vol. 44, no. 2, pp. 145–151.

11. Weijer C. Bioethics for clinicians: 10 Research ethics. *CMAJ: Canadian Medical Association journal*, 1997, vol. 156, no. 8, pp. 1153–1160.

12. Valentini G., Bencivelli W., Bombardieri S., D'Angelo S., Della Rossa A., Silman A. J., Black C. M., Czirjak L., Nielsen H., G. Vlachoyiannopoulos P. European Scleroderma Study Group to define disease activity criteria for systemic sclerosis. III. Assessment of the construct validity of the preliminary activity criteria. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003, vol. 62, no. 9, pp. 901–904. https://doi.org/10.1136/ard.62.9.901

13. Gontar' I. P., Zborovskii A. B. Levkin S. V., Sycheva G. F. *Method for producing magnetic polyacrylamide granules*. Patent for the invention of the Russian Federation no. 1582657, 1993 (in Russian).

Информация об авторах

Трофименко Андрей Степанович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского (ул. Землячки, 76, 400138, г. Волгоград, Российская Федерация). http:/ orcid.org/0000-0002-1627-8483. E-mail: a.s.trofimenko@mail.ru

Емельянова Ольга Ивановна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского (ул. Землячки, 76, 400138, г. Волгоград, Российская Федерация). https://orcid.org/0000-0003-3951-8985. E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Русанова Ольга Александровна – канд. мед. наук, мл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А. Б. Зборовского (ул. Землячки, 76, 400138, г. Волгоград, Российская Федерация). http://orcid.org/0000-0002-7080-2442. E-mail: olga-rusanova28@rambler.ru

Information about the authors

Andrey S. Trofimenko – Ph. D. (Med.), Head of the Laboratory. Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A. B. Zborovsky (76, Zemlyachki Str., 400138, Volgograd, Russian Federation). http:/ orcid.org/0000-0002-1627-8483. E-mail: a.s.trofimenko@mail.ru

Olga I. Emelyanova – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A. B. Zborovsky (76, Zemlyachki Str., 400138, Volgograd, Russian Federation). https://orcid.org/0000-0003-3951-8985. E-mail: emelyanova.vlg@mail.ru

Olga A. Rusanova – Ph. D. (Med.), Junior Researcher. Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A. B. Zborovsky (76, Zemlyachki Str., 400138, Volgograd, Russian Federation). http://orcid.org/0000-0002-7080-2442. E-mail: olga-rusanova28@rambler.ru

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.152.21:616.36:612.017.4:612.5:577.112.382.6
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-147-157

Поступила в редакцию 11.01.2023
Received 11.01.2023

Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт, С. А. Жадан, Т. В. Абакумова, Ф. Д. Яковлев

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ОБ УЧАСТИИ ВАЛИНА КРОВИ И L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В РАЗВИТИИ ГИПЕРТЕРМИИ, ФОРМИРОВАНИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СОСТОЯНИЯ ПРИ СТРЕССЕ, ВЫЗЫВАЕМОМ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭНДОТОКСИНОМ

Аннотация. Общеизвестна значимость свободных аминокислот в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии. В то же время данные о роли валина плазмы крови в процессах формирования тиреоидного статуса, прооксидантно-антиоксидантного состояния и развития гипертермии, вызываемой бактериальным эндотоксином, отсутствуют, хотя его участие в этих процессах вполне закономерно, поскольку валин является ингибитором аргиназы, активность которой сказывается на уровне аминокислоты аргинина и монооксида азота (NO), имеющих важное значение в регуляции температуры тела, процессов перекисного окисления липидов и уровня йодсодержащих гормонов.

Цель исследования – выяснение значимости валина плазмы крови и L-аргинин-NO системы в процессах формирования тиреоидного статуса, прооксидантно-антиоксидантного состояния и поддержания температуры тела при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином.

В экспериментах на крысах и кроликах установлено, что в условиях действия в организме животных липополисахарида (ЛПС) *E. coli* имеют место активация системы гипофиз–щитовидная железа, процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови и печени, повышение содержания нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-), снижение уровней валина и аргинина в плазме крови и повышение температуры тела. В условиях депрессии аргиназы печени L-валином (100 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до инъекции эндотоксина) действие ЛПС не сопровождается повышением температуры тела, приводит к менее выраженным изменениям в процессах ПОЛ, более значимому снижению содержания трийодтиронина и повышению уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови крыс. Предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO L-NAME (25 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до инъекции ЛПС) не только ослабляет подъем температуры тела и повышение уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови на действие эндотоксина, но и усугубляет изменения в процессах ПОЛ плазмы крови и печени, а также препятствует активации системы гипофиз–щитовидная железа.

Ключевые слова: валин, L-аргинин-NO система, тиреоидный статус, прооксидантно-антиоксидантное состояние, оксидативный стресс, температура тела, бактериальный эндотоксин

Для цитирования: Об участии валина крови и L-аргинин-NO системы в развитии гипертермии, формировании тиреоидного статуса и прооксидантно-антиоксидантного состояния при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином / Ф. И. Висмонт [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 147–157. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-147-157

Frantishek I. Vismont, Arvid F. Vismont, Svetlana A. Zhadan, Tatyana V. Abakumova, Fedor D. Yakovlev

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

PARTICIPATION OF BLOOD VALINE AND L-ARGININE-NO SYSTEM IN THE DEVELOPMENT OF HYPERTHERMIA, THE FORMATION OF THYROID STATUS AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT STATE UNDER STRESS DUE TO BACTERIAL ENDOTOXIN

Abstract. The importance of free amino acids in the processes of vital activity in normal and pathological conditions is well known. At the same time, there are no data on the role of blood plasma valine in the formation of thyroid status, prooxidant-antioxidant state, and in the development of hyperthermia caused by bacterial endotoxin, although its participation in these processes is quite natural, since valine is an inhibitor of arginase, the activity of which affects the level of arginine amino acid and nitric monoxide (NO). This is important in the regulation of body temperature, lipid peroxidation processes, and the level of iodine-containing hormones.

The aim of the study was to elucidate the significance of blood plasma valine and the L-arginine-NO system in the formation of thyroid status, prooxidant-antioxidant state and the maintenance of body temperature during stress caused by bacterial endotoxin.

In experiments on rats and rabbits, it was found that under the conditions of *E. coli* lipopolysaccharide action in the body of animals, the pituitary-thyroid gland system, lipid peroxidation (LPO) processes in the blood and liver activate, the nitrate/nitrite (NO_3^-/NO_2^-) content increases, the level of valine and arginine in the blood plasma decreases, and body temperature

increases. Under the conditions of depression of liver arginase with L-valine (100 mg/kg intraperitoneally 30 minutes before endotoxin injection), the LPS action is not accompanied by an increase in body temperature, leads to less pronounced changes in lipid peroxidation processes, as well as to a more significant decrease in the triiodothyronine content and to an increase in the NO_3^-/NO_2^- level in blood plasma in rats. Preliminary administration of the NO synthesis inhibitor L-NAME (25 mg/kg intraperitoneally 30 minutes before endotoxin injection) into the animal body not only reduces body temperature rise and NO_3^-/NO_2^- level increase in the blood plasma when acted upon by endotoxin, but also exacerbates changes in the LPO processes in the blood plasma and liver, and prevents the activation of the pituitary-thyroid gland system.

Keywords: valine, L-arginine-NO system, thyroid status, prooxidant-antioxidant state, oxidative stress, body temperature, bacterial endotoxin

For citation: Vismont F. I., Vismont A. F., Zhadan S. A., Abakumova T. V., Yakovlev F. D. Participation of blood valine and L-arginine-NO system in the development of hyperthermia, the formation of thyroid status and prooxidant-antioxidant state under stress due to bacterial endotoxin. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 147–157 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-147-157

Введение. В последнее время в нашей стране и за рубежом наблюдается повышение интереса к физиологии и вопросам клинического применения аминокислот и их производных. Значение аминокислот определяется их уникальной ролью не только в построении, промежуточном синтезе основных структурных компонентов клеток, целого ряда физиологически активных веществ, но и в процессах метаболизма и энергетического обмена, в реализации через них большинства функций, обеспечивающих взаимоотношение живых систем с внешней средой [1, 2].

Выяснение роли аминокислот в механизмах и процессах развития гипертермии, формировании тиреоидного статуса и прооксидантно-антиоксидантного состояния при стрессе представляет интерес в плане понимания общих закономерностей развития стресса как эндогенного, так и экзогенного происхождения, а также для изыскания на этой основе средств и способов направленной коррекции процессов теплообмена и других важных физиологических функций.

Общеизвестно, что в патогенезе нарушений жизнедеятельности при экстремальных состояниях организма, вызванных действием самых разнообразных по своей природе раздражителей, при различных заболеваниях как инфекционной, так и неинфекционной природы, сопровождающихся окислительным стрессом и повышением температуры тела, в механизмах поддержания температурного гомеостаза и резистентости к факторам среды обитания особо важное значение имеет функциональное состояние печени – образуемые ею многочисленные физиологически активные вещества, в частности монооксид азота (NO), продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3–6]. Рядом исследователей доказано, что печень играет особо значимую роль и в метаболизме гормонов щитовидной железы, обеспечивая регуляцию их обмена и поддержания оптимальной концентрации в крови [7–9].

Известно, что NO, субстратом для образования которого является аминокислота L-аргинин [10, 11], играет важную роль в протекании различных физиологических и патологических процессов, а также в регуляции температуры тела [12–14].

Ранее нами было показано, что функциональная активность аргиназы печени имеет важное значение в патогенезе гипертермии, вызываемой как бактериальным эндотоксином, так и перегреванием [15, 16]. Учитывая, что содержание валина в крови, который является ингибитором аргиназы печени [17, 18], будет сказываться на активности L-аргинин-NO системы, определяющей уровень NO [11, 19], были основания полагать, что уровень валина в плазме крови и активность L-аргинин-NO системы организма будут иметь значение в формировании тиреоидного статуса, прооксидантно-антиоксидантного состояния и температуры тела при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином. Однако участие валина крови и L-аргинин-NO системы в этих процессах при бактериальной эндотоксинемии не было предметом специального комплексного исследования.

Целью данной работы было выяснить значимость валина крови и L-аргинин-NO системы в формировании тиреоидного статуса, прооксидантно-антиоксидантного состояния организма и поддержании температуры тела при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах обоего пола массой 160–200 г и кроликах-самцах массой 2,5–3 кг. Для создания экспериментальной модели оксидативного стресса использовали бактериальный липополисаха-

рид (ЛПС) – эндотоксин *E. coli* (serotype 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно в краевую вену уха: кроликам – в дозе 0,5 мкг/кг, крысам – внутрибрюшинно в дозе 5,0 мкг/кг.

Для выяснения значимости валина плазмы крови и активности L-аргинин-NO системы в изучаемых процессах использовали аминокислоту L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). L-валин в дозе 100 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно за 30 мин до начала опыта. L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили однократно: кроликам – внутривенно, крысам – внутрибрюшинно за 30 мин до инъекции ЛПС.

Взятие у животных крови для исследований проводилось сразу после декапитации. Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C_8. Активность аргиназы в печени определяли спектрофотометрически [20]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню NO_3^-/NO_2^- в плазме крови [21].

Экспериментальный гипотиреоз воспроизводили с помощью тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина), который в дозе 25,0 мг/кг на 1 %-ном крахмальном растворе вводили крысам интрагастрально ежедневно в течение 20 дней. Для создания модели экспериментального гипертиреоза был использован синтетический гормон трийодтиронин (Liothyronine, Berlin-Chemie, Германия), который на 1 %-ном крахмальном клейстере вводили зондом в полость желудка крысам в течение 20 сут в дозе 30 мкг/кг.

Активность процессов ПОЛ в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов, как диеновые конъюгаты (ДК), малоновый диальдегид (МДА), основания Шиффа (ОШ), а состояние системы антиоксидантной защиты – по концентрации α-токоферрола (α-ТФ) и активности каталазы (КТ). Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически по методу M. Mihara, M. Uchiyama [22], концентрацию ДК – спектрофотометрически по методу, предложенному В. А. Костюком с соавт. [23]. Уровень ОШ оценивали спектрофотометрически по методу B. L. Fletcher с соавт. [24], активность КТ – колориметрическим методом [25], содержание α-ТФ в крови и ткани печени – флуоресцентным методом Р. Ч. Черняускене с соавт. [26].

Содержание тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (T_3) и тетрайодтиронина (T_4) в плазме крови определяли с помощью наборов реактивов производства УП ХОП ИБОХ НАН Беларуси.

У крыс и кроликов ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Все полученные цифровые данные анализировали с помощью статистической программы Statistica 10 (TIBCO Software Inc., США) и обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики, используя критерий Стьюдента для независимых выборок. Все данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($X \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В опытах на крысах установлено, что внутрибрюшинное введение животным ($n = 12$) ЛПС (5,0 мкг/кг) приводит к медленному нарастанию температуры тела и слабовыраженной гипертермии. Температура тела через 120 и 180 мин после инъекции эндотоксина повышалась на 1,3 °С ($p < 0,05$) и 1,2 °С ($p < 0,05$) и составляла 38,9 ± 0,1 и 38,8 ± 0,12 °С соответственно. Введение в кровоток ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам ($n = 9$) приводило к быстрому и значительному повышению у животных ректальной температуры. Температура тела через 30, 60 и 120 мин после введения бактериального эндотоксина возрастала на 0,6 °С ($p < 0,05$), 1,3 °С ($p < 0,05$) и 1,6 °С ($p < 0,05$) соответственно.

Обнаружено, что через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС в плазме крови крыс повышалась концентрация ТТГ на 32,1 % ($p < 0,05$, $n = 10$) и 40,7 % ($p < 0,05$, $n = 10$), снижался уровень T_3 на 33,3 % ($p < 0,05$, $n = 10$), а содержание T_4 повышалось на 24,2 % ($p < 0,05$, $n = 10$) на 180-й минуте действия бактериального эндотоксина. Изменение содержания ТТГ, T_3 и T_4 в плазме крови и температуры тела у крыс после внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 5,0 мкг/кг представлены в табл. 1.

Действие ЛПС у кроликов ($n = 7$) через 30 и 60 мин после введения бактериального эндотоксина в кровоток вызывало повышение уровня ТТГ на 22,1 % ($p < 0,05$) и 26,7 % ($p < 0,05$) и снижение

Т а б л и ц а 1. **Изменение содержания ТТГ, T_3 и T_4 в плазме крови и температуры тела крыс после внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 5,0 мкг/кг ($X \pm S_x$)**

T a b l e 1. **Change in the TSH, T_3 and T_4 content in blood plasma and in the rat body temperature after intraperitoneal injection of LPS at a dose of 5.0 μg/kg ($X \pm S_x$)**

Группа животных	ТТГ, мМЕ/л	T_3, нмоль/л	T_4, нмоль/л	Температура тела, °С
Контрольная (K_1), интактные животные (n = 9)	2,7 ± 0,32	1,5 ± 0,12	56,8 ± 5,24	37,2 ± 0,11
Контрольная (K_2):				
через 120 мин после введения физраствора (n = 7)	2,8 ± 0,31	1,3 ± 0,12	66,6 ± 5,71	37,6 ± 0,12
через 180 мин после введения физраствора (n = 7)	2,7 ± 0,35	1,2 ± 0,09	55,8 ± 4,83	37,6 ± 0,09
Опытная:				
через 120 мин после введения ЛПС (n = 7)	3,7 ± 0,40*	1,0 ± 0,13	61,8 ± 5,25	38,8 ± 0,13*
через 180 мин после введения ЛПС (n = 7)	3,8 ± 0,44*	0,8 ± 0,10*	69,3 ± 5,13*	38,6 ± 0,12*

П р и м е ч а н и е. * – изменения достоверны по отношению к K_1 ($p < 0,05$); n – число животных.

концентрации T_4 на 51,1 % ($p < 0,05$) и 24,3 % ($p < 0,05$) соответственно. Концентрация T_3 в крови в этих условиях понижалась на 35,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным уровнем, если действие ЛПС длилось 60 мин. Содержание ТТГ, T_3 и T_4 в плазме крови животных контрольной группы (n = 8) через 30 и 60 мин после введения в кровоток апирогенного физраствора составляло 31,2 ± 2,15 мМЕ/л, 8,9 ± 0,63 нмоль/л, 72,1 ± 12,30 нмоль/л и 30,5 ± 2,84 мМЕ/л, 8,5 ± 0,60 нмоль/л, 73,6 ± 10,21 нмоль/л.

При гипертермии, вызываемой бактериальным эндотоксином (через 120 мин после инъекции ЛПС), в плазме крови крыс (n = 7) снижалось содержание ряда аминокислот (табл. 2): глутамина – на 12,7 % ($p < 0,05$), аргинина – на 32,4 % ($p < 0,02$), тирозина – на 26,4 % ($p < 0,01$), валина – на 21,1 % ($p < 0,001$).

Т а б л и ц а 2. **Изменение содержания (мкмоль/л) свободных аминокислот в плазме крови крыс через 120 мин после внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 5,0 мкг/кг ($X \pm S_x$)**

T a b l e 2. **Change in the free amino acid content (μmol/l) in the rat blood plasma 120 minutes after intraperitoneal injection of LPS at a dose of 5.0 μg/kg ($X \pm S_x$)**

Название аминокислоты	Контроль (внутрибрюшинное введение физраствора)	Опыт (внутрибрюшинное введение ЛПС)
Аспарагин	69,4 ± 4,78	63,9 ± 12,13
Аспартат	58,6 ± 6,71	50,1 ± 8,33
Серин	496,3 ± 35,19	452,2 ± 14,99
Глутамат	293,2 ± 15,14	317,1 ± 32,10
Глутамин	870,8 ± 34,14	759,1 ± 38,94*
Гистидин	125,6 ± 9,63	104,0 ± 4,81
Глицин	552,0 ± 37,71	591,7 ± 38,98
Аргинин	242,0 ± 22,69	163,5 ± 12,96*
Аланин	679,8 ± 55,93	475,2 ± 89,69
Таурин	218,2 ± 32,99	265,1 ± 62,37
ГАМК	2,4 ± 0,82	2,9 ± 1,22
Тирозин	75,1 ± 6,36	55,3 ± 5,16*
Валин	169,3 ± 7,61	133,6 ± 8,12*
Метионин	58,1 ± 5,84	49,7 ± 3,57
Триптофан	58,9 ± 5,68	49,9 ± 5,46
Изолейцин	76,5 ± 3,56	70,7 ± 4,52
Фенилаланин	80,7 ± 3,81	72,6 ± 7,04
Лейцин	165,5 ± 12,87	140,6 ± 13,33
Гидроксипролин	18,7 ± 7,08	27,4 ± 8,57
Лизин	914,4 ± 142,98	674,7 ± 97,18
Пролин	147,0 ± 18,62	127,9 ± 28,97
Треонин	298,4 ± 21,50	316,9 ± 34,17

П р и м е ч а н и е. * – изменения достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$); количество животных в каждой серии – 8.

Установлено, что при гипертермии, вызываемой бактериальным эндотоксином, изменяется активность аргиназы печени и концентрация в плазме крови крыс NO_3^-/NO_2^- – конечных продуктов деградации NO. Действие ЛПС у крыс через 120 и 180 мин после введения эндотоксина в организм приводило к повышению активности аргиназы печени на 53,1 % (n = 8) и 39,2 % (n = 7), а также уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови животных на 29,6 % ($p < 0,05$, n = 7) и 60,7 % ($p < 0,05$, n = 7) по сравнению с контролем. Активность аргиназы печени и уровень NO_3^-/NO_2^- в плазме крови крыс контрольной группы через 120 и 180 мин после внутрибрюшинного введения физраствора составляли 5,6 ± 0,27 мкмоль мочевины/г сырой ткани·ч (n = 7) и 5,0 ± 0,22 мкмоль мочевины/г сырой ткани·ч (n = 7) и 7,0 ± 0,40 и 9,8 ± 1,30 мкмоль/л соответственно.

Действие ЛПС в организме у крыс сопровождалось активацией процессов ПОЛ. Так, количество ДК в печени увеличивалось на 25,6 % ($p < 0,05$, n = 7) и 38,2 % ($p < 0,05$, n = 7) через 120 и 180 мин после инъекции эндотоксина, а в плазме крови – на 14,5 % ($p < 0,05$, n = 7) на 180-й минуте гипертермии, вызываемой эндотоксином. Концентрация МДА в печени в этих условиях возрастала на 18,8 % ($p < 0,05$, n = 7) и 32,2 % ($p < 0,05$, n = 7) соответственно, в плазме крови – на 70,8 % ($p < 0,05$, n = 7) и 91,5 % ($p < 0,05$, n = 6). Повышался уровень ОШ: в печени – на 51,8 % ($p < 0,05$, n = 6) и 92,3 % ($p < 0,05$, n = 7), в плазме крови – на 95,1 % ($p < 0,05$, n = 6) и 128,1 % ($p < 0,05$, n = 6). У животных контрольной группы (n = 7) через 180 мин после инъекции физраствора концентрации ДК, МДА и ОШ в плазме крови и печени составляли соответственно 0,65 ± 0,036 D233/мл и 15,3+1,21 D233/г ткани, 0,78 ± 0,050 мкмоль/мл и 16,5 ± 0,59 мкмоль/г ткани, 4,2 ± 0,71 ЕД/мл и 127,1 + 12,35 ЕД/г ткани. Обнаружено, что действие ЛПС в организме крыс через 180 мин после инъекции приводит к снижению концентрации α-ТФ на 39,2 % ($p < 0,05$, n = 7) и 25,1 % ($p < 0,05$, n = 7) в плазме крови и печени соответственно. Активность КТ через 120 и 180 мин после введения эндотоксина снижалась: в плазме крови – на 20,1 % ($p < 0,05$, n = 6) и 24,8 % ($p < 0,05$, n = 7), в печени – на 15,8 % ($p < 0,05$, n = 7) и 19,7 % ($p < 0,05$, n = 7). Содержание α-ТФ и активность КТ в плазме крови и печени у крыс (n = 7) в контроле составляли 2,25 ± 0,31 нмоль/мл и 193,4 ± 9,72 нмоль/г ткани, 13,5 ± 3,47 ЕД/мл и 316,0 ± 28,5 ЕД/г ткани соответственно.

В опытах на крысах установлено, что через 20 сут после ежедневного интрагастрального введения экзогенного T_3 в дозе 30 мкг/кг у гипертиреоидных животных температура тела повышалась на 0,7 °С ($p < 0,05$, n = 10). При этом концентрация T_3 в плазме крови увеличивалась на 53,8 % – с 1,3 ± 0,15 до 2,0 ± 0,27 нмоль/л ($p < 0,05$, n = 8), а концентрация T_4 снижалась на 22,1 % – с 52,4 ± 4,11 до 40,8 ± 3,51 нмоль/л ($p < 0,05$, n = 8). Обнаружено, что в условиях гипертиреоза у крыс повышается активность аргиназы печени и активируются процессы ПОЛ в плазме крови и печени. Так, через 20 сут после ежедневного интрагастрального введения экзогенного T_3 у животных (n = 7) имело место повышение активности аргиназы печени на 41,0 % ($p < 0,05$), снижение уровня валина в плазме крови на 31,7 ($p < 0,05$) и увеличение содержания в плазме крови и печени основных продуктов ПОЛ. Количество ДК в печени увеличивалось на 41,7 % ($p < 0,05$, n = 6), а в плазме крови – на 30,5 % ($p < 0,05$, n = 7). Концентрация МДА в печени в этих условиях возрастала на 25,2 % ($p < 0,05$, n = 6), в плазме крови – на 29,8 % ($p < 0,05$, n = 6). Уровень ОШ в печени и плазме крови повышался на 61,3 % ($p < 0,05$, n = 6) и 33,4 % ($p < 0,05$, n = 7) соответственно. У животных контрольной группы (n = 6), получавших ежедневно в течение 20 сут интрагастрально 1 %-ный крахмальный клейстер, концентрации ДК, МДА и ОШ в печени и плазме крови составляли 11,4 ± 1,03 $\Delta Д_{233}$/г, 16,2 ± 0,67 нмоль/г, 138,5 ± 11,6 ЕД/г ткани и 0,56 ± 0,051 $\Delta Д_{233}$/мл, 0,71 ± 0,044 мкмоль/мл, 5,17 ± 0,53 ЕД/мл соответственно.

Обнаружено, что в условиях гипертиреоза в организме крыс наряду с повышением ректальной температуры и активацией процессов ПОЛ в крови и печени изменяется состояние атиоксидантной системы в исследуемых тканях. Так, через 20 сут после ежедневного интрагастрального введения трийодтиронина гидрохлорида (30 мкг/кг) достоверных сдвигов в содержании α-ТФ

в плазме крови и печени опытных животных по сравнению с контрольными не выявлено, однако активность КТ в этих условиях повышалась на 23,1 % ($p < 0,05$, $n = 6$). Содержание α-ТФ и активность КТ в печени животных контрольной группы составляла 181,3 ± 10,22 нмоль/г и 340 ± 25,3 ЕД/г ткани соответственно.

У гипотиреоидных крыс наблюдалось снижение температуры тела, концентрации йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и активности аргиназы печени. Так, до начала введения на 1 %-ном растворе крахмала тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина) в дозе 25 мг/кг ректальная температура у крыс опытной группы составляла 37,6 ± 0,11 °С ($n = 8$), а через 20 сут его применения снижалась на 0,8 °С ($p < 0,05$). У животных контрольной группы, получавших интрагастрально 1 %-ный раствор крахмала, ректальная температура составляла 37,5 ± 0,12 °С ($n = 7$). Концентрация T_3 и T_4 в плазме крови у гипотиреоидных крыс по сравнению с таковой в контрольной группе (интрагастральное введение 1 %-ного крахмального раствора в течение 20 сут) снижалась в 2,6 раза ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$) и составляла 0,54 ± 0,07 нмоль/л ($n = 7$) и 16,4 ± 1,05 нмоль/л ($n = 7$) соответственно. Уровень ТТГ в плазме крови повышался на 61,5 % ($p < 0,05$, $n = 6$) и составлял 2,1 ± 0,23 мМЕ/л.

Наряду со снижением температуры тела у гипотиреоидных крыс имело место снижение активности аргиназы печени на 26,6 % ($p < 0,05$, $n = 7$). У крыс контрольной группы ($n = 7$) через 20 сут ежедневного интрагастрального введения 1 %-ного раствора крахмала она составляла 3,9 ± 0,31 мкмоль мочевины/г ткани·ч.

Изучение процессов ПОЛ у гипотиреоидных крыс не выявило достоверных различий между животными с гипотиреозом и нормальным тиреоидным статусом в содержании основных продуктов ПОЛ (ДК, МДА, ОШ), а также α-ТФ и активности КТ в плазме крови и печени.

Учитывая имеющиеся в литературе сведения о том, что действие в организме бактериальных эндотоксинов вызывает экспрессию индуцибельной изоформы NO-синтазы и приводит к обра-

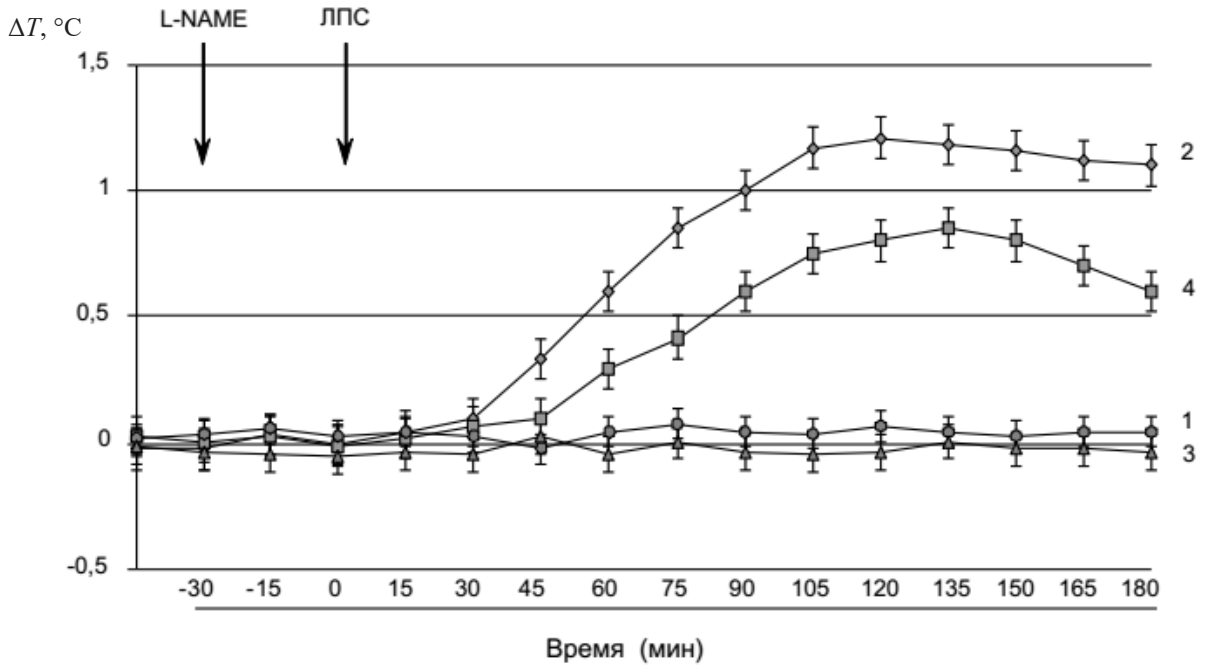


Рис. 1. Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения:
1 – физраствора; *2* – ЛПС (5 мкг/кг); *3* – L-NAME (25 мг/кг); *4* – ЛПС (5 мкг/кг) в условиях действия L-NAME (25 мг/кг).
Стрелка – момент введения препаратов. Количество животных в каждой группе – 9

Fig 1. Change in the rat rectal temperature after intraperitoneal injection:
1 – saline; *2* – LPS (5 μg/kg); *3* – L-NAME (25 mg/kg); *4* – LPS (5 μg/kg) under the action of L-NAME (25 mg/kg).
Arrow – moment of drug administration; *n* – number of animals in each group is 9

зованию больших количеств NO, играющего важную роль в терморегуляции [5, 12], представляло интерес выяснить, как будет изменяться температура тела при действии ЛПС в условиях предварительного введения в организм веществ, угнетающих активность L-аргинин-NO системы.

В опытах на крысах был использован неселективный ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США) в дозе 25 мг/кг – дозе, существенно не влияющей на температуру тела в норме.

В экспериментах на крысах установлено, что действие ЛПС (5 мкг/кг) при предварительном введении (за 30 мин до внутрибрюшинной инъекции эндотоксина) в организм лабораторных животных L-NAME сопровождается развитием менее выраженной гипертермией. Так, ректальная температура у крыс, получивших только ЛПС (n = 8), через 120 и 180 мин после инъекции повышалась на 1,2 и 1,1 °С соответственно, в то время как у животных, которые получили ЛПС в условиях действия L-NAME (n = 8), в указанные промежутки времени после введения эндотоксина повышение температуры наблюдалось всего лишь на 0,8 и 0,6 °С (рис. 1).

Установлено, что предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO L-NAME не только ослабляет подъем температуры тела на действие эндотоксина, но и усугубляет изменения в процессах ПОЛ плазмы крови и печени, а также препятствует активации системы гипофиз – щитовидная железа в этих условиях.

Обнаружено, что действие ЛПС в организме у крыс, предварительно получивших (за 30 мин до инъекции эндотоксина) внутрибрюшинно L-NAME (25 мг/кг), сопровождается более выраженными изменениями в процессах ПОЛ в крови и печени. Обнаружено, что через 180 мин после инъекции ЛПС (5,0 мкг/кг) действие бактериального эндотоксина в организме животных в этих условиях сопровождается более значимым по сравнению с контролем (внутрибрюшинное введение физраствора и ЛПС) повышением в плазме крови концентрации ДК – на 139,5 % (p < 0,05, n = 8), МДА – на 102,9 % (p < 0,05, n = 7), ОШ – на 71,3 % (p < 0,05, n = 7) и снижением активности

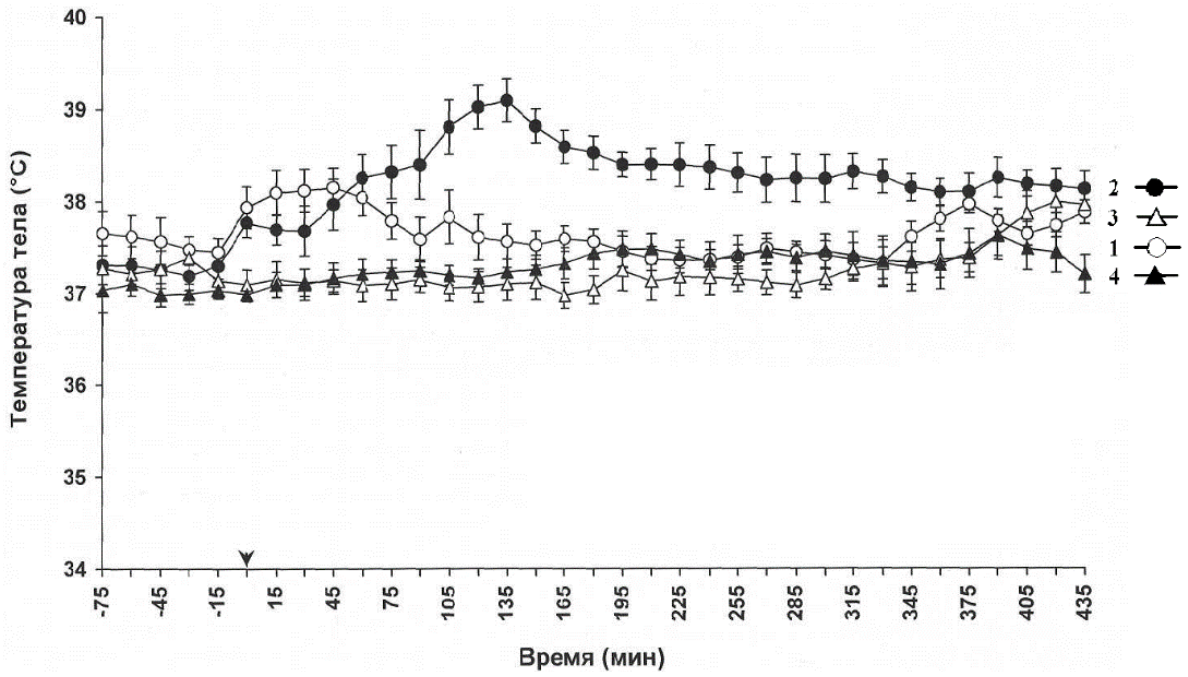


Рис. 2. Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения:
1 – физраствора (n = 8); *2* – ЛПС (50,0 мкг/кг, n = 8); *3* – L-валина (100,0 мг/кг, n = 6); *4* – ЛПС (50,0 мкг/кг) в условиях действия L-валина (100,0 мг/кг, n = 7). Стрелка – момент введения ЛПС (50,0 мкг/кг), n – количество животных в группе

Fig. 2. Change in the rat rectal temperature after intraperitoneal injection:
1 – saline (n = 8); *2* – LPS (50.0 μg/kg, n = 8); *3* – L-valine (100.0 mg/kg, n = 6); *4* – LPS (50.0 μg/kg) under the action of L-valine (100.0 mg/kg, n = 7). Arrow – moment of LPS administration (50.0 μg/kg), n – number of animals in the group

КТ на 49,1 % ($p < 0,05$, $n = 6$). В печени в этих условиях содержание ДК возрастало на 32,1 % ($p < 0,05$, $n = 8$), а активность КТ снижалась на 30,6 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Обнаружено, что у крыс ($n = 7$) действие ЛПС через 120 мин после инъекции в условиях угнетения активности NO-синтазы сопровождается более выраженным снижением уровня T_3 (на 20,1 %, $p < 0,05$) и снижением (а не повышением) уровня T_4 в плазме крови на 35,3 % ($p < 0,05$) по сравнению с действием ЛПС. Выявлено, что у крыс ($n = 7$) в условиях предварительного (за 30 мин до инъекции эндотоксина) введения в организм L-NAME (25 мг/кг) действие ЛПС через 120 мин после инъекции сопровождается снижением в плазме крови уровня NO_3^-/NO_2^- на 48,7 % ($p < 0,05$).

Однократная внутрибрюшинная инъекция крысам ингибитора аргиназы L-валина в дозе 100 мг/кг через 120 мин после введения препарата статистически значимо не сказывалась на ректальной температуре тела и приводила к снижению активности аргиназы печени на 83,5 % ($p < 0,05$, $n = 8$). У животных контрольной группы ($n = 7$), получавших внутрибрюшинно физраствор, активность аргиназы печени составляла 5,7 ± 0,51 мкмоль мочевины/г ткани·ч.

Выявлено, что в условиях депрессии аргиназы печени L-валином (100 мг/кг внутрибрюшинно за 30 мин до инъекции эндотоксина) действие ЛПС не сопровождается повышением температуры тела. Температура тела у крыс ($n = 7$) под влиянием ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина повышалась на 1,2 ± 0,14 ºС ($p < 0,01$) и 1,1 ± 0,11 ºС ($p < 0,01$) соответственно, а в условиях действия L-валина через 2 и 3 ч после введения ЛПС – на 0,5 ± 0,06 и 0,4 ± 0,02 ºС ($n = 8$). В условиях действия в организме L-валина повышение температуры тела на ЛПС не отмечалось, даже если эндотоксин вводили в дозе 50,0 мкг/кг (рис. 2).

В опытах на крысах показано, что при предварительном угнетении активности аргиназы печени L-валином действие ЛПС через 120 мин после инъекции эндотоксина сопровождается менее выраженными изменениями в процессах ПОЛ и более значительным возрастанием (по сравнению с животными контрольной группы) T_4 в плазме крови. Содержание T_3 в плазме крови в этих условиях (по отношению к животным в контроле, получавшим физраствор и ЛПС) значительно снижалось – на 43,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$). Установлено, что через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС в условиях действия в организме животных L-валина содержание NO_3^-/NO_2^- в плазме крови повышается по сравнению с контролем (действие только одного эндотоксина) на 57,4 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 91,2 % ($p < 0,05$, $n = 6$) соответственно.

Заключение. Таким образом, можно заключить, что валин крови и L-аргинин-NO система участвуют в формировании тиреоидного статуса, прооксидантно-антиоксидантного состояния и в поддержании температуры тела при стрессе, вызываемом бактериальным эндотоксином. Окислительный стресс, индуцированный введением липополисахарида *E. coli*, характеризуется повышением температуры тела, активности аргиназы печени, системы гипофиз – щитовидная железа и снижением в крови уровней валина, аргинина, α-токоферола, активности каталазы и увеличением содержания в крови и печени диеновых конъюгатов, малонового альдегида и оснований Шиффа. В условиях депрессии аргиназы печени L-валином (100 мг/кг) действие ЛПС не сопровождается повышением температуры тела, приводит к менее выраженным изменениям в процессах ПОЛ, более значимому снижению содержания трийодтиронина и повышению уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови крыс. Предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO L-NAME (25 мг/кг) не только ослабляет подъем температуры тела и повышение уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови на действие эндотоксина, но и усугубляет изменения в процессах ПОЛ плазмы крови и печени, а также препятствует активации системы гипофиз – щитовидная железа. Таким образом, изменения в процессах ПОЛ в печени и плазме крови крыс в условиях угнетения аргиназы печени L-валином, по-видимому, обусловлены сдвигами в активности L-аргинин-NO системы и в содержании в крови трийодтиронина. Формирование прооксидантно-антиоксидантного состояния, тиреоидного статуса и температуры тела на действие бактериального эндотоксина у крыс и кроликов зависит от уровня валина в плазме крови, определяющего активность аргиназы печени и состояние L-аргинин-NO системы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Шейбак, В. М. Лейцин, изолейцин, валин: биохимические основы разработки новых лекарственных средств / В. М. Шейбак. – Гродно : ГрГМУ, 2014. – 242 с.

2. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов : в 2 т. / А. О. Сыровая [и др.]. – Харьков : Щедра садиба плюс, 2015. – Т. 2. – 268 с.

3. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 1985. – Т. 29, № 4. – С. 80−86.

4. Blokade of Kupffer cells prevents the belrile and preoptic prostaglandin E2 responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs / E. Sehic [et al.] // Annals N. Y. Acad. Sci. – 1997. – Vol. 813. – P. 448–452. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51732.x

5. Тэйлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тэйлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 905–923.

6. Nitric oxide in the liver: physiopathological roles / H. Suzuki [et al.] // Adv. Neuroimmunol. – 1995. – Vol. 5, N 4. – P. 379–410. https://doi.org/10.1016/0960-5428(95)00024-0

7. Фабри, З. П. Функциональная активность щитовидной железы и распределение ее гормонов в периферических тканях при экспериментальном поражении печени / З. П. Фабри, А. Е. Пащенко, И. П. Заячук // Укр. биохим. журн. – 1985. – Т. 57, № 2. – С. 84–87.

8. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review / G. S. Kelly // Altern. Med. Rev. – 2000. – Vol. 5, N 4. – P. 306–333.

9. Висмонт, Ф. И. Роль детоксикационной функции печени в формировании тиреоидного статуса организма и терморегуляции / Ф. И. Висмонт, М. А. Глебов // Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности. – 2013. – № 2. – С. 61–65.

10. Morris, S. M. (Jr.). Enzymes of arginine metabolism / S. M. Morris (Jr.) // J. Nutr. – 2004. – Vol. 134, suppl. 10. – P. 2743S–2747S. https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2743S

11. Scibior, D. Arginine-metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321–332.

12. Gerstberger, R. Nitric oxide and body temperature control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, N 1. – P. 30–36. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30

13. Moncada, S. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology / S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs // Pharmacol. Rev. – 1991. – Vol. 43, N 2. – P. 109–142.

14. Holowatz, L. A. Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive human / L. A. Holowatz, W. L. Kenney // J. Physiol. – 2007. – Vol. 581, pt. 2. – P. 863–872. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128959

15. Висмонт, А. Ф. Роль аргиназы печени и мочевины крови в процессах теплообмена, детоксикации, формирования тиреоидного статуса и тепловой устойчивости / А. Ф. Висмонт, Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2014. – № 2. – С. 48–55.

16. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия, дисрегуляция и формирование предболезни / Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 7–16.

17. Carvajal, N. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginase by proline and branched chain amino acids / N. Carvajal, S. D. Cederbaum // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol. 870, N 2. – P. 181–184. https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90219-0

18. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease / R. W. Caldwell [et al.] // Physiol. Rev. – 2018. – Vol. 98, N 2. – P. 641–665. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016

19. Boucher, J. L. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization / J. L. Boucher, C. Moali, J. P. Tenu // Cell. Mol. Life Sci. – 1999. – Vol. 55, N 8–9. – P. 1015–1028. https://doi.org/10.1007/s000180050352

20. Geyer, J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 39, N 2. – P. 412–417. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3

21. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, N 6, pt. 1. – P. 892−896.

22. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precusor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 86, N 1. – P. 271–278. https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1

23. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопр. мед. химии. – 1984. – Т. 30, № 4. – С. 125–127.

24. Fletcher, B. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues / B. L. Fletcher, C. L. Dillard, A. L. Tappel // Anal. Biochem. – 1973. – Vol. 52, N 1. – P. 1–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90327-8

25. Боборико, Т. Л. Определение каталазной активности в биологическом материале / Т. Л. Боборико, Г. Т. Маслова, В. Н. Леонтьев. – М., 1988. – Деп. в ВИНИТИ. – № 1512–В88.

26. Черняускене, Р. Ч. Одновременное флюорометрическое определение концентраций витаминов Е и А в сыворотке крови / Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас // Лаб. дело. – 1984. – № 6. – С. 362–365.

References

1. Sheibak V. M. *Leucine, isoleucine, valine: biochemical foundations for the development of new drugs*. Grodno, Grodno State Medical University, 2014. 242 p. (in Russian).

2. Syrovaya A. O., Shapoval L. G., Makarov V. A., Petyunina V. N., Grabovetskaya E. R., Andreeva S. V. [et al.]. *Amino acids through the eyes of chemists, pharmacists, biologists. Vol. 2.* Kharkiv, Shchedra sadiba plyus Publ., 2015. 268 p. (in Russian).

3. Mayanskii D. N. Kupffer cells and liver pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* [Pathological physiology and experimental medicine], 1985, vol. 29, no. 4, pp. 80−86 (in Russian).

4. Sehic E., Hunter W. C., Ungar A. L., Blatteis C. M. Blokade of Kupffer cells prevents the belrile and preoptic prostaglandin E2 responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, vol. 813, pp. 448–452. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51732.x

5. Taylor B. S., Alarcon L. H., Billiar T. R. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry*, 1998, vol. 63, no. 7, pp. 766–781 (in Russian).

6. Suzuki H., Menegazzi M., Carcereri de Prati A., Mariotto S., Armato U. Nitric oxide in the liver: physiopathological roles. *Advances in Neuroimmunology*, 1995, vol. 5, no. 4, pp. 379–410. https://doi.org/10.1016/0960-5428(95)00024-0

7. Fabri Z. P., Pashchenko A. E., Zayachuk I. P. Functional activity of the thyroid gland and the distribution of its hormones in peripheral tissues in experimental liver damage. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* [Ukrainian biochemical journal], 1985, vol. 57, no. 2, pp. 84–87 (in Russian).

8. Kelly G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Alternativ Medical Review*, 2000, vol. 5, no. 4, pp. 306–333.

9. Vismont F. I., Glebov M. A. The role of the detoxification function of the liver in the formation of the thyroid status of the body and thermoregulation. *Mediko-biologicheskie problemy zhiznedeyatel'nosti* [Medico-biological problems of life], 2013, no. 2, pp. 61–65 (in Russian).

10. Morris S. M. (Jr.). Enzymes of arginine metabolism. *Journal of Nutrition*, 2004, vol. 134, suppl. 10, pp. 2743S–2747S. https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2743S

11. Scibior D., Czeczot H. Arginine – metabolism and functions in the human organism. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2004, vol. 58, pp. 321–332 (in Polish).

12. Gerstberger R. Nitric oxide and body temperature control. *News in Physiological Sciences*, 1999, vol. 14, no. 1, pp. 30–36. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1999.14.1.30

13. Moncada C., Torres V., Varghese G., Albano E., Israel Y. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms. *Molecular Pharmacology*, 1994, vol. 46, no. 2, pp. 786–791.

14. Holowatz L. A., Kenney W. L. Up-regulation of arginase activity contributes to attenuated reflex cutaneous vasodilatation in hypertensive human. *Journal of Physiology*, 2007, vol. 581, pt. 2, pp. 863–872. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.128959

15. Vismont A. F., Vismont F. I. The role of liver arginase and blood urea in the processes of heat transfer, detoxification, formation of thyroid status and thermal stability. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2014, no. 2, pp. 48–55 (in Russian).

16. Vismont F. I. Endotoxinemia, dysregulation and the pre-illness formation. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, vol. 15, no. 1, pp. 7–16 (in Russian).

17. Carvajal N., Cederbaum S. D. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginase by proline and branched chain amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986, vol. 870, no. 2, pp. 181–184. https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90219-0

18. Caldwell R. W., Rodriguez P. C., Toque H. A., Narayanan S. P., Caldwell R. B. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. *Physiological Reviews*, 2018, vol. 98, no. 2, pp. 641–665. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016

19. Boucher J. L., Moali C., Tenu J. P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1999, vol. 55, no. 8–9, pp. 1015–1028. https://doi.org/10.1007/s000180050352

20. Geyer J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 39, no. 2, pp. 412–417. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3

21. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clinical Chemistry*, 1995, vol. 41, no. 6, pt. 1, pp. 892–896.

22. Mihara M., Uchiyama T. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 1978, vol. 86, no. 1, pp. 271–278.https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1

23. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Lunets E. F. Spectrophotometric determination of diene conjugates. *Voprosy meditsinskoi khimii* [Problems of medical chemistry], 1984, no. 4, pp. 125–127 (in Russian).

24. Fletcher B. L., Dillard C. L., Tappel A. L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Analytical Biochemistry*, 1973, vol. 52, no. 1, pp. 1–9. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90327-8

25. Boboriko T. L., Maslova G. T., Leont'ev V. N. *Determination of catalase activity in biological material*. Moscow, 1988, dep. at VINITI, no. 1512–B88. (in Russian).

26. Chernyauskene R. Ch., Varshkyavichene Z. Z., Gribauskas P. S. Simultaneous fluorometric determination of the concentrations of vitamins E and A in blood serum. *Laboratornoye delo* [Laboratory business], 1984, no. 6, pp. 362–365 (in Russian).

Информация об авторах

Висмонт Франтишек Иванович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Висмонт Арвид Франтишкович – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Жадан Светлана Анатольевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Абакумова Татьяна Вячеславовна – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Яковлев Федор Дмитриевич – ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by

Information about the authors

Frantishek I. Vismont – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

Arvid F. Vismont – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

Svetlana A. Zhadan – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

Tatyana V. Abakumova – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

Fedor D. Yakovlev – Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.24-002.5-002.5[576.8:579.716.5]
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167

Поступила в редакцию 19.09.2022
Received 19.09.2022

В. В. Слизень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич[1]

Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Республика Беларусь

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР С ГИДРОЛИЗНЫМИ ЗОНДАМИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Аннотация. Ранняя диагностика резистентности к фторхинолонам дает возможность своевременно начать адекватную терапию и повышает шансы на благоприятный исход заболевания. Использование молекулярно-генетических методов исследования позволяет получить в течение 1–2 сут результаты определения устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к противотуберкулезным лекарственным средствам, в то время как при использовании классических методов результаты становятся известны почти через 1–2 мес.

Цель работы – разработка метода детекции *M. tuberculosis* и точечных мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* гена, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам.

Исследовано 88 культур микобактерий: *M. tuberculosis* (*n* = 81), *M. tuberculosis H37Rv*, *M. chelonae* (*n* = 1), *M. gordonae* (*n* = 1), *M. fortuitum* (*n* = 1) и 3 изолята других нетуберкулезных микобактерий. Типы мутаций в гене *gyrA* изучены с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, стандартного метода GenoType MTBDRsl (HAIN, Германия) и секвенирования по Сэнгеру. Анализ мутаций в *gyrA* гене 78 изолятов *M. tuberculosis* показал, что доминирующими были мутации p.Asp94Gly и p.Ala90Val, которые идентифицированы у 21 и 27 изолятов соответственно: в структуре мутаций на их долю приходится 64 %. У *M. tuberculosis* встречались также мутации p.ASP94ALA и p.ASP94TYR/HIS – у 6 (8,0 %) и 9 (12,0 %) изолятов соответственно. У одного штамма присутствовала мутация в 88-м кодоне и у одного штамма найдена двойная мутация (ALA90VAL и ASP94GLY). Результаты по выявлению мутаций разработанным методом ПЦР в реальном времени совпадают с результатами GenoType MTBDRsl и секвенирования.

Разработанный метод ПЦР в реальном времени демонстрирует высокую частоту совпадений с данными фенотипического определения устойчивости к офлоксацину и результатами тестирования с помощью стандартного метода GenoType MTBDRsl и секвенирования. С помощью данного метода можно выявлять возбудителей туберкулеза, дискриминировать мутации p.ALA90VAL, p.SER91PRO, p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, p.ASP94GLY, p.ASP94ASN, что позволяет диагностировать устойчивость к фторхинолонам.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, устойчивость к фторхинолонам, мутации в гене *gyrA*, гидролизные зонды для детекции мутаций устойчивости к фторхинолонам, диагностика форм лекарственно-устойчивого туберкулеза

Для цитирования: Слизень, В. В. Использование ПЦР с гидролизными зондами для выявления мутаций устойчивости к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis* / В. В. Слизень, Л. К. Суркова, Г. Л. Гуревич // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 158–167. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167

Veronika V. Slizen, Larissa K. Surkova, Gennady L. Gurevich

Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry, Minsk, Republic of Belarus

PCR WITH HYDROLYSIS PROBES FOR DETECTION OF FLUOROQUINOLONE RESISTANCE MUTATIONS IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Abstract. Early diagnostics of resistance to fluoroquinolones facilitates early start of adequate therapy and increases the chance of a favorable outcome of the tuberculosis. Application of genetic methods permits to obtain within 1–2 days the results of *Mycobacterium tuberculosis* resistance detection to anti-tuberculosis drugs, unlike the classical methods requiring up to 1–2 month.

The aim of the study is to develop a method for the *M. tuberculosis* identification and detection of point mutations in codons 90, 91, 94 of the *gyrA* gene associated with the resistance to fluoroquinolones.

There were 88 cultures of mycobacteria studied: *M. tuberculosis* (*n* = 81), *M. tuberculosis H37Rv*, *M. chelonae* (*n* = 1), *M. gordonae* (*n* = 1), *M. fortuitum* (*n* = 1), and other three isolates of non-tuberculosis mycobacteria isolated from patients in the Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry. The types of mutations in the gyrA gene were studied by the standard GenoTypeMTBDRsl method (HAIN, Germany), Sanger sequencing, and by the developed real-time

© Слизень В. В., Суркова Л. К., Гуревич Г. Л., 2023

PCR method. Based on the analysis of mutations in the *gyrA* gene in 78 isolates of *M. tuberculosis*, the dominant mutations were found to be mutations Asp94Gly and Ala90Val, which were identified in 21 and 27 isolates correspondingly: they accounted for 64 % of all mutations. *M. tuberculosis* also harbored mutations p.ASP94ALA and p.ASP94TYR/HIS in 6 (8.0 %) and 9 (12.0 %) isolates, respectively. One strain harbored a mutation at triplet 88 and one strain had a double mutation (p.ALA90VAL and p.ASP94GLY). The developed real-time PCR method demonstrated a high frequency of coincidence of results with the phenotypic determination of resistance to ofloxacin and the results testing by the standard GenoTypeMTBDRsl method and sequencing.

The developed method is accomplished to identify *M. tuberculosis*, and discriminate mutations p.ALA90VAL, p.SER91PRO, p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, p.ASP94GLY, p.ASP94ASN providing diagnostics of resistance to fluoroquinolones.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, resistance to fluoroquinolones, mutations in the *gyrA* gene, hydrolysis probes for the detection of resistance to fluoroquinolones mutations, diagnostics of forms of drug-resistant tuberculosis

For citation: Slizen V. V., Surkova L. K., Gurevich G. L. PCR with hydrolysis probes for detection of fluoroquinolone resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 158–167 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-158-167

Введение. Эпидемиология туберкулеза (ТБ) в современных условиях в Республике Беларусь характеризуется сохранением высокого уровня множественно и широко лекарственно-устойчивого (МЛУ, ШЛУ) ТБ как среди впервые выявленных, так и среди ранее леченных пациентов [1, 2]. Лекарственно-устойчивый ТБ является серьезной проблемой здравоохранения во многих регионах мира, представляя серьезную угрозу в глобальном масштабе. Показатель заболеваемости туберкулезом в Беларуси в 2021 г. составлял 12,7 на 100 000 населения, при этом на МЛУ-ТБ в 2021 г. у впервые выявленных пациентов приходилось 37,8 %, у ранее леченых − 63,2 %. В 2021 г. было зарегистрировано 617 случаев МЛУ-ТБ.

В последние годы лекарственные средства группы фторхинолонов приобретают особое значение в лечении МЛУ-ТБ. К этой группе лекарственных средств *Mycobacterium tuberculosis* могут проявлять резистентность, формируя пул *M. tuberculosis* с пре-ШЛУ и ШЛУ [3]. В Беларуси доля ШЛУ-ТБ в 2021 г. среди впервые выявленных составляла 12,8 % (в 2018 г. – 16,2 %, в 2019 г. – 17,1 %), среди ранее леченых – 39,3 % (в 2018 г. – 50,6 %, в 2019 г. – 49,8 %) [4–6]. Резистентность к фторхинолонам МБТ с МЛУ резко ограничивает возможность лечения и уменьшает шанс на успех терапии, а сочетание ВИЧ-инфекции и ШЛУ МБТ почти всегда ведет к летальному исходу [7–10].

Ранняя диагностика устойчивости к фторхинолонам позволяет своевременно скорректировать терапию и увеличить шанс на благоприятный исход заболевания. Определение спектра резистентности к противотуберкулезным лекарственным средствам с использованием классических методов занимает длительный срок (до 1 мес.), что открывает перспективы для использования молекулярно-генетических методов исследования, с помощью которых результаты могут быть получены в течение 1–2 сут. Это диктует необходимость разработки методов экспресс-диагностики устойчивости к фторхинолонам МБТ.

Фторхинолоны ингибируют ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, которая разрывает и сшивает двухцепочечную ДНК, обеспечивая тем самым появление отрицательных суперзавитков в ДНК. ДНК-гираза необходима для процессов репликации, транскрипции, рекомбинации и состоит из двух субъединиц – A и B, кодируемых генами *gyrA* и *gyrB.* Топоизомераза IV является также гетеродимером и состоит из субъединиц ParC и ParE, кодируемых у микроорганизмов генами *parC* и *parE.* У большинства бактерий есть два фермента: ДНК-гираза и топоизомераза IV, в то время как у МБТ нет ParC и ParE, а ДНК-гираза одновременно обладает функцией топоизомеразы IV. Таким образом, ДНК-гираза − единственная мишень для антибиотиков фторхинолонового ряда у МБТ [3, 11–15].

Резистентность к фторхинолонам у 60−90 % изолятов микобактерий обусловлена мутациями в 21 bp фрагменте *gyrA* гена. Согласно данным исследований, проведенных в Швеции, Голландии, Испании, Китае и России, мутации в *gyrA* отмечаются у штаммов, у которых минимальная ингибирующая концентрация офлоксацина составляет более 2 мкг/мл (уровень, предложенный в качестве порогового для определения клинической резистентности). У МБТ мутации могут встречаться и в регионах за пределами 21 bp фрагмента *gyrA* гена, а также в *gyrB* гене, но присутствие мутаций в других локусах *gyrA* и *gyrB* не всегда сопряжено с формированием устойчи-

вости к фторхинолонам. Мутации в *gyrB* могут приводить к устойчивости к фторхинолонам, но уровень резистентности, а также разновидности препаратов, к которым он формируется, зависят от типа и локализации мутаций. Большинство исследователей из разных стран отмечают доминирование среди резистентных к фторхинолонам МБТ мутаций в *gyrA* гене в кодонах 88 (p.GLY88CYS), 89 (p.ASP89GLY), 90 (ALA90VAL), 91 (SER91PRO), 94 (p.ASP94GLY, p.ASP94ALA, p.ASP94HIS, p.ASP94TYR, p.ASP94ASN), что позволяет рассматривать эти кодоны как маркеры резистентности к фторхинолонам [10, 11, 13, 15–20]. Определение полиморфизма единичных нуклеотидов (ПЕН) в *gyrA* гене МБТ является важным клиническим аспектом диагностики, прогнозирования и профилактики распространения пре-ШЛУ и ШЛУ-ТБ. Внедрение в клиническую лабораторную практику высокоспецифичных и дискриминативных молекулярно-биологических методов открывает огромные перспективы в ранней диагностике лекарственной устойчивости и своевременной коррекции химиотерапии пре-ШЛУ и ШЛУ-ТБ.

Цель работы – разработать метод детекции *M. tuberculosis* и точечных мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* гена *M. tuberculosis*, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, с использованием ПЦР в реальном времени.

Объекты и методы исследования. Объектом исследований являлись 88 культур микобактерий: *M. tuberculosis* (*n* = 81), *M. chelonae* (*n* = 1), *M. gordonae* (*n* = 1), *M. fortuitum* (*n* = 1), три изолята других видов нетуберкулезных микобактерий (18087, 18353, 18109), выделенных от пациентов в ГУ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», а также референтный штамм *M. tuberculosis H37Rv*. Типы мутаций в гене *gyrA* изучены с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, GenoType MTBDRsl (HAIN, Германия) и секвенирования по Сэнгеру.

Выделение ДНК. ДНК микобактерий экстрагировали путем нагревания суспензии МБТ при 98 °С в течение 20 мин в 5 %-ном Chelex-100 и 1×TAE буфере с последующим центрифугированием 20 мин при 13 000 g.

Амплификация gyrA гена. При проведении ПЦР локуса *gyrA* гена размером 320 п. о. использовали праймеры 320-GyrA-F (CAGCTACATCGACTATGCGA) и 320-GyrA-R (GGGCTNCGGTGTACCTCAT), взятые в концентрации 20 пкмоль на реакцию [21]. Отдельную ПЦР проводили с помощью реакционных смесей объемом 50 мкл, содержащих: 1×PCR буфер с $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 мМ MgCl2, 2 мМ каждого дНТФ, 1,25 ед. Taq-полимеразы (ОАО «Праймтех»), по 20 пкмолей каждого праймера, 6–10 мкл образца ДНК. Использовали следующий режим амплификации: 95 °С – 5 мин, 38 циклов при 95 °С (35 с), 60 °С (40 с) и 72 °С (50 с). ПЦР-продукты (10 мкл) визуализировали гель-электрофорезом (100 мА − 60 мин) в 1,5 %-ном агарозном геле и 1×TAE буфере.

Секвенирование по Сэнгеру. Для определения мутаций в *gyrA* гене в локусе проводили секвенирование фрагмента этого гена (320 н. т.) у 33 клинических изолятов *M. tuberculosis*. Ампликоны очищали с помощью наборов QIAquick-spin PCR clean up columns (Quiagen) или GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, NA1020) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили с помощью набора для секвенирования ABI PRISM BigDye ® Terminator 3.1, капиллярный секвенирующий электрофорез осуществляли на секвенаторе ABI PRISM® 310. Для секвенирующей ПЦР готовили реакционную смесь: 1,1 мкл праймера GyrA320 (в концентрации 1,6 пкмоль/мкл), BigDye Terminator (1,6 мкл), 3 мкл ПЦР-продуктов. Объем пробы доводили деионизованной безнуклеазной водой до 14 мкл, после чего импульсно ультрацентрифугировали и амплифицировали в режиме: 1) быстрый подъем температуры до 96 °С; 2) 32 цикла: 96 °С – 45 с; 60 °С – 3 мин 40 с; 65 °С – 50 с. Очистку продуктов секвенирования проводили путем добавления 2 мкл 3 М ацетата натрия и 20 мкл этанола (99,7 %) с последующим центрифугированием 40 мин при 13 000 об/мин при температуре 4 °С. Секвенирующий капиллярный электрофорез для каждой пробы ставили дважды, используя следующие режимы: инъекция – 50 с и 2,5 кВ, пробег – 12,2 кВ, 50 °С; инъекция – 30 с и 3 кВ, пробег – 12,2 кВ, 42 °С). Результаты секвенирования визуально проверяли на наличие ошибок расшифровки. Анализ секвенированного олигонуклеотида проводили с использованием программы BLAST или MEGA 5 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast и http://www.megasoftware.net/).

Разработка праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени с гидролизными зондами для выявления устойчивости к фторхинолонам. Информацию о первичной структуре генов

gyr A и *rrs Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (с целью выявления родоспецифических маркеров микобактерий) получали с использованием данных международных баз геномов GenBank, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/: код доступа, GenBank, NCBI – NC_000962.2). С помощью онлайн-программ оценивали конформацию и силу связи образуемых олигонуклеотидов, температуру плавления вторичных структур (http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold, http://www.atdbio.com/tools/ oligo-calculator), проводили проверку специфичности праймеров (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ tools/primer-blast/), рассчитывали образование гетеро- и аутодимеров и энергию их связи, а также температуру плавления олигонуклеотидов, в том числе LNA (http://eu.idtdna.com/analyzer/ApplicationsOligoAnalyzer/). Место отжига праймеров и зондов определяли с помощью программы http://bioinformatics.org/ seqext/.

ПЦР в реальном времени для определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам. Для детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, готовили 4 реакционные смеси. В реакционной смеси 1 присутствовали праймеры и зонды для идентификации МБТ и рода микобактерий: праймер прямой и обратный для МБТ (IS6110) – по 20 пмоль каждого, зонд для детекции МБТ – 10 пмоль, праймеры прямой и обратный для определения рода микобактерий – по 20 пмоль каждого, зонд для определения рода микобактерий ($rrs_{598\text{-}77}$) – 10 пмоль. Мутации в 90-м и 91-м кодонах определяли в реакционной смеси 2. Ее состав был следующим (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, разработанный зонд к «дикому» типу кодонов 90 и 91 – 10, зонд к мутантному типу кодона 90 – 10, зонд к мутантному типу кодона 91 – 10, зонд к гену *gyrA* – 15. Реакционная смесь 3 содержала (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, зонд для детекции «дикого» типа кодона p.94ASP – 10, зонд для детекции мутации p.94ALA – 10, зонд для детекции мутации p.94 TYR/HIS – 10, зонд для контроля амплификации *gyrA* ($gyrA_{215–233}$) – 15. Реакционная смесь 4 включала (в пмоль): праймер прямой и обратный для *gyrA* гена – 25 и 15 соответственно, зонд для детекции «дикого» типа кодона p.94ASP – 10, зонд для детекции мутации p.94GLY – 10, зонд для детекции мутации p.94ASN – 10, зонд для контроля амплификации *gyrA* ($gyrA_{215–233}$)) – 15. Во всех пробирках присутствовали следующие реагенты: 10×ПЦР-буфер с KCl – 5 мкл, 25 мМ $MgCl_2$ – 5 мкл, раствор dNTP (5 ммоль/мл dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – 7,5 мкл, бетаин 5М – 5 мкл, трегалоза 5М – 5 мкл, Taq полимераза – 2,5 ед., свободная от нуклеазы деионизованная вода – до 40 мкл, экстрагированная ДНК микобактерий – 10 мкл.

Режим амплификации с целью определения мутаций резистентности к фторхинолонам в *gyrA* гене был следующим: 95 °С – 10 мин, 50 циклов при 95 °С (35 с) и 60 °С (70 с). Детекцию флуоресценции проводили на стадии отжига (70 с при 60 °С) на каналах R6G (возбуждение – 526 нм, экстинкция – 555 нм), FAM (возбуждение – 492 нм, экстинкция – 517 нм), ROX (возбуждение – 580 нм, экстинкция – 605 нм), Cy5 (возбуждение – 649 нм, экстинкция – 666 нм). В качестве положительного контроля без мутаций в *gyrA* гене использован референс-штамм *M. tuberculosis* H37Rv.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0, Excel (Microsoft).

Результаты и их обсуждение. Кодон 90 характеризуется присутствием GCG в положениях 268, 269, 270 соответственно. В этом кодоне, как правило, происходит однотипная миссенс-мутация в положении 269, сопровождающаяся заменой GCG→GTG, которая приводит к замене кодируемой аминокислоты с аланина на валин. В кодоне 91 находятся нуклеотиды TCG в положениях 271, 272, 273. Однотипная мутация в этом кодоне происходит в положении 271 и сопровождается заменой TCG→CCG, что приводит к замене кодируемой аминокислоты с серина на пролин. В 94-м кодоне gyrA располагается триплет GAC, кодирующий аспарагиновую кислоту. Происходящие в этом кодоне мутации могут приводить к заменам на GCC, CAC, TAC и AAC, которые кодируют аланин, гистидин, тирозин, аспарагин. Разработанный метод предполагает определение мутаций в 90, 91, 94-м кодонах *gyrA* с использованием трех реакционных смесей. В реакционной смеси 1 по флуоресценции выше пороговой проводится выявление микроорганизмов из рода микобактерий и МБТ на каналах FAM и ROX соответственно, в реакционной смеси 2 происходит детекция мутаций в 90-м и 91-м кодонах, в реакционной смеси 3 определяются

мутации p.ASP94ALA, p.ASP94TYR/HIS, а в реакционной смеси 4 – мутации p.ASP94HIS и p.ASP94ASN. В разработанном методе используется подход парных зондов, когда в реакционной смеси присутствует два зонда – к «дикому» типу кодона и к мутированному, при этом зонды к «дикому» типу мечены флуорофором FAM, а два зонда – к двум вариантам мутаций (R6G и Cy5). Таким образом, в пробах с МБТ, имеющих мутации в 90, 91, 94-м кодонах, флуоресцирует зонд, меченный R6G либо Cy5, в то время как FAM-зонд к «дикому» типу кодонов не флуоресцирует. В пробах с МБТ, не имеющих мутаций в 90, 91, 94-м кодонах, флуоресцирует FAM-зонд, специфичный к «дикому» типу кодона, в то время как R6G и Cy5 зонды к «мутантному» типу кодонов не флуоресцируют. В реакционных смесях, в которых присутствует ДНК МБТ, выявляется флуоресценция на канале ROX, что является контролем амплификации *gyrA* гена. Появление мутаций другого типа на участке gyrA273-289/290 сопровождается исчезновением флуоресценции как на канале FAM, так и на каналах R6G и Cy5, при этом флуоресценция на канале ROX остается, что подтверждает наличие в образце МБТ (по наличию гена *gyrA*). В случае нетуберкулезных микобактерий и отсутствия МБТ в пробе флуоресценция отсутствует на всех каналах FAM, R6G, Cy5, ROX. Но в реакционной смеси 1 выявляется флуоресценция на канале FAM, что свидетельствует о присутствии микобактерий в образце. В табл. 1 приведен состав охраноспособных зондов и праймеров для детекции мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам у МБТ. На рисунке приведены результаты получаемых кривых флуоресценции (RFU) с помощью разработанного метода.

Т а б л и ц а 1. **Разработанные праймеры и зонды, необходимые для амплификации *gyrA* гена и выявления в нем мутаций в 90, 91 и 94-м кодонах**

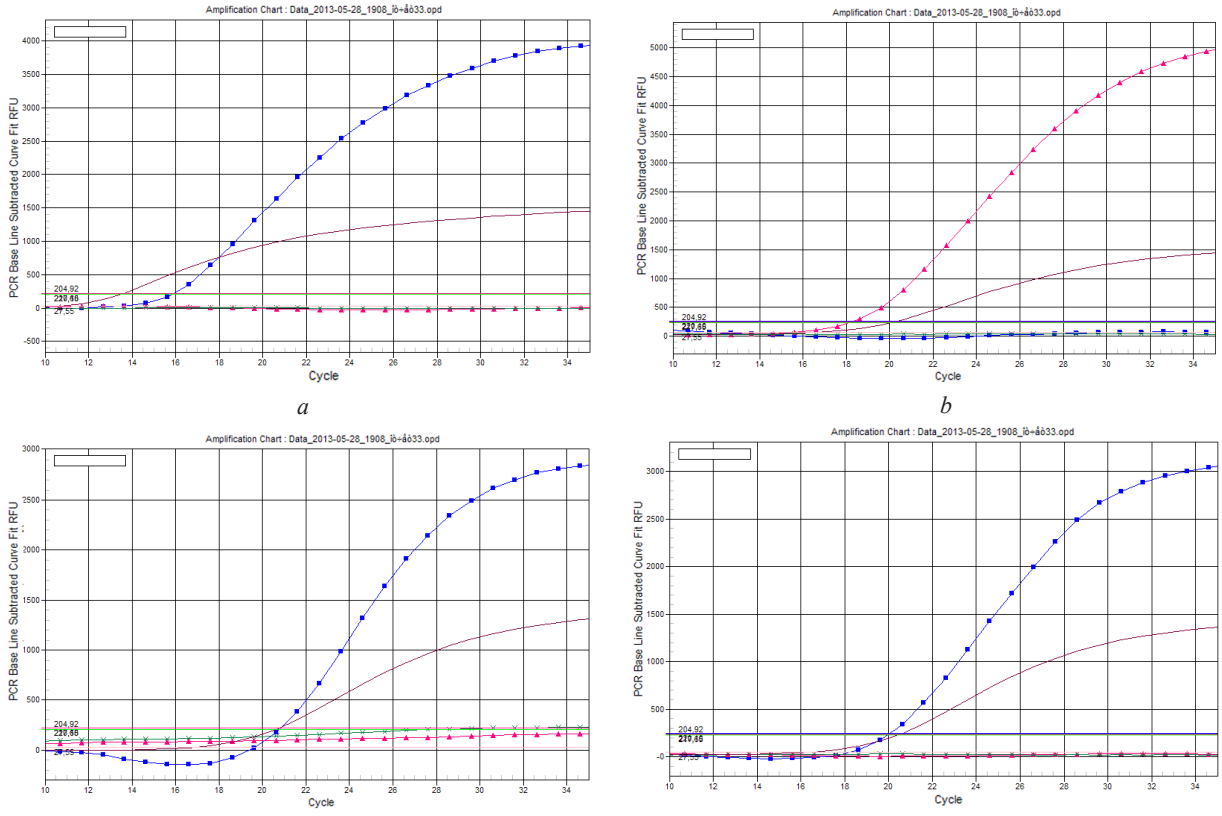
T a b l e 1. **Designed primers and probes for the *gyrA* gene amplification and detection of mutations at codons 90, 91, and 94**

Специфичность	Тип	Флуоро-фор	Олигонуклеотид 5→3	Гаситель	Концентрация, пкмоль/мкл
Гидролизные пробы и праймеры реакционной смеси 1					
Детекция *M. tuberculosis*	Прямой IS 6110 F		TCGCCTACGTGGCCTTTG		20
	Обратный IS 6110 R		GGATAACGTCTTTCAGGTCGAGTAC		20
	Проба	ROX	CGCTTCCACGATGGCCACCTC	BHQ-2	10
Детекция рода микобактерий	Прямой *rrs* MB-F_{452-73}		ACCATCGACGAAGGTTCGGGT		20
	Обратный *rrs* MB-R_{623-03}		ACGCTCACAGTTAAGCCGTGA		20
	Проба MB-pr_{598-77}	FAM	TCACGAACAACGCGACAAACCA	BHQ1	10
Праймеры для амплификации *gyrA* гена для реакционных смесей 2, 3, 4					
Праймеры для *gyrA* размером 194 п. о.	Прямой *gyrA*-$F_{180-198}$/194	Нет	CGATTCCGGCTTCCGCCCG	Нет	15
	Обратный *gyrA*-$R_{374-353}$/194	Нет	CGGTGGGTCATTGCCTGGCG	Нет	25
Гидролизные пробы реакционной смеси 2					
Детекция GCG и TCG в 90-м и 91-м кодонах	*gyrA*, 90-й и 91-й кодоны	FAM	ATCGACGCGTCGCCGTG	BHQ-1	10
Детекция GTG в 90-м кодоне	*gyrA*, 90-й кодон	R6G	TCGTAGATCGACACGTCGC	BHQ-1	10
Детекция CCG в 91-м кодоне	*gyrA*, 91-й кодон	Cy5	TCGTAGATCGGCGCGTCGC	BHQ-2	10
Контроль *gyrA*	*gyrA* (*gyrA* $_{215-233}$)	ROX	AGTCGGCCCGGTCGGTTGC	BHQ2	10
Гидролизные пробы реакционной смеси 3					
Детекция GAC в 94-м кодоне	Детекция 94-го кодона «дикого» типа ASP	FAM	ACCAGGS[+T]G[+T]CG[+T]AGAT[1]	BHQ-1	10
Детекция GGC в 94-м кодоне	Детекция 94-го кодона с мутацией GLY	R6G	ACCAGGS[+T]G[+C]CG[+T]AGAT[1]	BHQ-1	10
Детекция AAC в 94-м кодоне	Детекция 94-го кодона с мутацией ASN	Cy5	CACCAGGSTGTTGTAGAT	BHQ-2	10
Контроль *gyrA*	*gyrA* (*gyrA* $_{215-233}$)	ROX	AGTCGGCCCGGTCGGTTGC	BHQ2	15

Окончание табл. 1

Специфичность	Тип	Флуоро-фор	Олигонуклеотид 5→3	Гаситель	Концентрация, пкмоль/мкл
Гидролизные пробы реакционной смеси 4					
Детекция gac в 94-м кодоне	Детекция 94-го кодона «дикого» типа ASP	FAM	ACCAGGS[+T]G[+T]CG[+T]AGAT[1]	BHQ-1	10
Детекция gcc в 94-м кодоне	Детекция 94-го кодона с мутацией ALA	R6G	CACCAGGSTGGCGTAGAT	BHQ-1	10
Детекция tac и cac в 94-м кодоне	Детекция мутации TYR/HIS	Cy5	AC[+C]AGGS[+T]GTRG+[+T]AGAT	BHQ-1	10
Контроль *gyrA*	GyrA (*gyrA* $_{215\text{-}233}$)	ROX	AGTCGGCCCGGTCGGTTGC	BHQ2	15

П р и м е ч а н и е. В скобках приведено положение нуклеотидов с LNA (замкнутые нуклеиновые кислоты).



a *b*

c *d*

---▲--- – канал R6G; **---■----** – канал FAM; **----X---** – канал CY5**,** **--------** – ROX

Пример определения мутации ALA90VAL в *gyrA* гене с помощью разработанного метода; культура *M. tuberculosis* 17801. Флуоресценция на канале R6G отмечается в реакционной смеси *b*, что свидетельствует о мутации ALA90VAL; *a* – детекция микобактерий и среди них МБТ, *b* – детекция мутаций ALA90VAL, SER91PRO; *c* – детекция мутации ASP94ALA и ASP94TYR/HIS; *d* – детекция мутации ASP94GLY, ASP94ASN. Флуоресценция на канале ROX в пробах *b*, *c*, *d* свидетельствует об амплификации *gyrA* гена

An example of results of ALA90VAL mutation detection in *gyrA* gene by the developed method; isolate *M. tuberculosis* 17801. Fluorescence at the R6G channel is observed in the reaction mixture *b*, which indicates an ALA90VAL mutation; *a* – detection of mycobacteria, including MBT; *b* – detection of mutations ALA90VAL, SER91PRO; *c* – detection of ASP94ALA and ASP94TYR/HIS mutations; *d* – detection of mutations ASP94GLY, ASP94ASN. Fluorescence at the ROX channel in samples *b*, *c*, *d* indicates amplification of the *gyrA* gene

На основании данных, полученных при секвенировании *gyrA* гена (секвенированы фрагменты размером 320 п. о. у 33 культур МБТ) и использовании стандартного метода GenoType MTBDRsl, охарактеризован профиль мутаций 78 изолятов МБТ. Результаты представлены в табл. 2.

При сравнительной оценке стандартного и разработанного методов изучены культуры *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* и три культуры других нетуберкулезных микобактерий − 18087, 18353, 18109, которые проявляли фенотипическую устойчивость к фторхинолонам. При исследовании обоими методами они были идентифицированы как микобактерии, но не как МБТ. Референтный штамм *M. tuberculosis* H37Rv, согласно результатам исследования с помощью разработанного метода, идентифицирован как МБТ, не несущий мутации. Выявлены некоторые расхождения в результатах при определении методом секвенирования, стандартным и разработанным методами (табл. 2).

Таблица 2. **Результаты определения мутаций в *gyrA* гене с помощью разработанного метода ПЦР в реальном времени, GenoType MTBDRsl, и секвенирования по Сэнгеру**

Table 2. **Results of mutations detection in the *gyrA* gene by the developed real-time PCR method, GenoType MTBDRsl, and Sanger sequencing**

Изоляты *M. tuberculosis*	Кол-во	Фенотип	Фенотип GenoType MTBDRsl	GenoType MTBDRsl, HAIN	Секвени-рование	Разработанный метод	Совпа-дение
Мутация p.ASP94GLY							
10952, 18628, 1499, 18413, 18338, 1542, 1535, 18128, 18754, 17928, 18112, 18023, 2305, 1602	14	R	R	ΔWT3, MUT3C p.ASP94GLY	94GLY	p.ASP94GLY	Да
18152, 4588, 583, 2413, 6215, 4588, 16687	7	R	R	ΔWT3, MUT3C p.ASP94GLY	–	p.ASP94GLY	Да
Мутация p.ASP94TYR/HIS							
18777, 5183, 633, 1481, 406	5	R	R	ΔWT3, MUT3D p.ASP94HIS		p.ASP94TYR/HIS	Да
18556, 18630, 1855, 18010	4	R	R	ΔWT3, MUT3D p.ASP94HIS	94 TYR	p.ASP94TYR/HIS	Да
Мутация p.SER91PRO							
1534, 1534, 1478, 6216	4	R	R	ΔWT2, MUT2 p.SER91PRO		p.SER91PRO	Да
1477, 17800, 17974	3	R	R	ΔWT2, MUT2 p.SER91PRO	91PRO	p.SER91PRO	Да
Мутация p.ALA90VAL							
17756, 17975, 18456, 16666, 1539, 1594, 583*, 7762, 667, 7562, 8190, 5995, 765, 621, 572	15	R	R	ΔWT2, MUT1, p.ALA90VAL		p.ALA90VAL	Да
18124, 1552, 17801, 1551, 17870, 18557, 1497, 18279, 1543, 1511, 1537, 1544	12	R	R	ΔWT2, MUT1, p.ALA90VAL	90VAL	p.ALA90VAL	Да
Мутация p.ASP94ALA							
17757, 7729, 1347	3	R	R	ΔWT3, MUT3A p.ASP94ALA		p.ASP94ALA	Да
17311, 18712, 1871	3	R	R	ΔWT3, MUT3A p.ASP94ALA	94ALA	p.ASP94ALA	Да
Другие мутации							
1133	1	R	R	C88S, A88T		mut+, 90-, 91-	Да
Отсутствие мутаций							
17364, 18747, 15675, 17803, 536, 422, 4122	7	S	S	wt1, wt2, wt3	w	w	Да
Расхождения при детекции фенотипическим, стандартным и разработанным методом							
1547	1	S	S	wt1, wt2, wt3	94GLY	p.ASP94GLY	Нет
1538	1	R	S	–	94ASN	w	Нет
18981	1	R	R–	ΔWT3, MUT3A (p.ASP94ALA)	94GLY	p.ASP94GLY	Нет

Примечание. * – две мутации в гене.

Доминирующими были мутации p.ASP94GLY и p.ALA90VAL, которые идентифицированы у 21 (25,9 ± 5,0 %) и 27 (33,3 ± 5,3 %) изолятов соответственно (в структуре мутаций микобактерий на их долю приходилось 59,2 ± 5,6 %). У МБТ также встречались мутации p.ASP94ALA и p.ASP94TYR/HIS – у 6 (7,7 ± 3,0 %) и 9 (11,5 ± 3,8 %) изолятов соответственно. У одного штамма присутствовала мутация в 88-м кодоне и у одного штамма найдена двойная мутация (p.ALA90VAL и p.ASP94GLY).

Результаты по выявлению мутаций методом ПЦР в реальном времени совпадают с результатами GenoType MTBDRsl и секвенирования. Было выявлено три расхождения (табл. 2). Показатели чувствительности, специфичности, положительной предсказательной ценности, эффективности разработанного метода составили 90,5; 87,5; 97,1 и 90,0 % соответственно.

Заключение. Разработанный метод ПЦР в реальном времени демонстрирует высокую частоту совпадений результатов с данными фенотипического определения устойчивости к офлоксацину и результатами тестирования с помощью стандартного метода GenoType MTBDRsl и секвенирования.

Данный метод позволяет выявлять возбудителей туберкулеза, дискриминировать мутации ALA90VAL, SER91PRO, ASP94ALA, ASP94TYR/HIS, ASP94GLY, ASP94ASN и определять устойчивость *M. tuberculosis* к фторхинолонам.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in gyrA and gyrB / A. Von Groll [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N 10. – P. 4498–4500. https://doi.org/10.1128/AAC.00287-09

2. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project / M. Zignol [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2016. – Vol. 16, N 10. – P. 1185–1192. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30190-6

3. Zhang, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015 / Y. Zhang, W.-W. Yew // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2015. – Vol. 19, N 11. – P. 1276–1289. https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389

4. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management challenges / K. Dheda [et al.] // Infect. Dis. Clin. – 2010. – Vol. 24, N 3. – P. 705–725. https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.05.001

5. Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany / G. B. Migliori [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 13, N 5. – P. 780–782. https://doi.org/10.3201/eid1305.060200

6. Extensively drug–resistant, tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital / C. Y. Jeon [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46, N 1. – P. 42–49. https://doi.org/10.1086/524017

7. Collins, C. H. In–vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin / C. H. Collins, A. H. Uttley // J. Antimicrob. Chemother. – 1985. – Vol. 16, N 5. – P. 575–580. https://doi.org/10.1093/jac/16.5.575

8. Drlica, K. Fluoroquinolones: action and resistance / K. Drlica, M. Malik // Curr. Top Med. Chem. – 2003. – Vol. 3, N 3. – P. 249–282. https://doi.org/10.2174/1568026033452537

9. Epidemiology and clinical management of XDR–TB: a systematic review by TBNET / G. Sotgiu [et al.] // Eur. Resp. J. – 2009. – Vol. 33, N 4. – P. 871–881. https://doi.org/10.1183/09031936.00168008

10. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success / L. S. Redgrave [et al.] Trends Microbiol. – 2014. – Vol. 22, N 8. – P. 438–445. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007

11. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control / A. Matteelli [et al.] // Expert Rev. Anti-infect. Ther. – 2007. – Vol. 5, N 5. – P. 857–871. https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.857

12. Alangaden, G. J. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases / G. J. Alangaden, S. A. Lerner // Clin. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 25, N 5. – P. 1213–1221. https://doi.org/10.1086/516116

13. Cambau, E. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the gyrA gene of mycobacteria / E. Cambau, W. Sougakoff, V. Jarlier // FEMS Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 116, N 1. – P. 49–54. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06674.x

14. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations / H. E. Takiff [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1994. – Vol. 38, N 4. – P. 773–780. https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773

15. Comprehensive treatment of extensively drug-resistant tuberculosis / C. D. Mitnick [et al.] // New Engl. J. Med. – 2008. – Vol. 359, N 6. – P. 563–574. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0800106

16. Piddock, L. J. V. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992–1994 / L. J. V. Piddock // Drugs. – 1995. – Vol. 49, suppl. 2. – P. 29–35. https://doi.org/10.2165/00003495-199500492-00006

17. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study / H. Cox [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2022. – Vol. 60, N 3. – P. e02362–21. https://doi.org/10.1128/jcm.02362-21

18. Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010–2011 / G. Günther [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 21, N 3. – P. 409. https://doi.org/10.3201/eid2103.141343

19. Yin, X. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China / X. Yin, Z. Yu // J. Infect. – 2010. – Vol. 61, N 2. – P. 150–154. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.05.001

20. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia / I. Mokrousov [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52, N 8. – P. 2937–2939. https://doi.org/10.1128/AAC.00036-08

21. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada / L. Bozeman [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 40, N 3. – P. 386–391. https://doi.org/10.1086/427292

References

1. Von Groll A., Martin A., Jureen P., Hoffner S., Vandamme P., Portaels F., da Silva P. A. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in gyrA and gyrB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, no. 10, pp. 4498–4500. https://doi.org/10.1128/AAC.00287-09

2. Zignol M., Dean A. S., Alikhanova N., Andres S., Cabibbe A. M., Cirillo D. M. [et al.]. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infectious Diseases*, 2016, vol. 16, no. 10, pp. 1185–1192. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30190-6

3. Zhang Y., Yew W.-W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, vol. 19, no. 11, pp. 1276–1289. https://doi.org/10.5588/ijtld.15.0389

4. Dheda K., Warren R. M., Zumla A., Grobusch M. P. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management challenges. *Infectious Disease Clinics*, 2010, vol. 24, no. 3, pp. 705–725. https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.05.001

5. Migliori G. B., Ortmann J., Girardi E., Besozzi G., Lange, C., Cirillo, D. M., SMIRA Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, vol. 13, no. 5, pp. 780–782. https://doi.org/10.3201/eid1305.060200

6. Jeon C. Y., Hwang S. H., Min J. H., Prevots D. R., Goldfeder L. C., Lee H., Via L. E. Extensively drug-resistant, tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 2008, vol. 46, no. 1, pp. 42–49. https://doi.org/10.1086/524017

7. Collins C. H., Uttley A. H. In-vitro susceptibility of mycobacteria to ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1985, vol. 16, no. 5, pp. 575–580. https://doi.org/10.1093/jac/16.5.575

8. Drlica K., Malik M. Fluoroquinolones: action and resistance. *Current Topics in Medical Chemistry*, 2003, vol. 3, no. 3, pp. 249–282. https://doi.org/10.2174/1568026033452537

9. Sotgiu G., Ferrara G., Matteelli A. A., Richardson M. D., Centis R., Ruesch-Gerdes S. [et al.]. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: a systematic review by TBNET. *European Respiratory Journal*, 2009, vol. 33, no. 4, pp. 871–881. https://doi.org/10.1183/09031936.00168008

10. Redgrave L. S., Sutton S. B., Webber M. A., Piddock L. J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, 2014, vol. 22, no. 8, pp. 438–445. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007

11. Matteelli A., Migliori G. B., Cirillo D., Centis R., Girard E., Raviglione M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2007, vol. 5, no. 5, pp. 857–871. https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.857

12. Alangaden G. J., Bone S. A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 1997, vol. 25, no. 5, pp. 1213–1221. https://doi.org/10.1086/516116

13. Cambau E., Sougakoff W., Jarlier V. Amplification and nucleotide sequence of the quinolone resistance-determining region in the gyrA gene of mycobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, vol. 116, no. 1, pp. 49–54. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06674.x

14. Takiff H. E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W. M., Kreiswirth B., Cole S. T., Jacobs W. R. (Jr.), Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1994, vol. 38, no. 4, pp. 773–780. https://doi.org/10.1128/AAC.38.4.773

15. Mitnick C. D., Shin S. S., Seung K. J., Rich M. L., Atwood S. S., Furin J. J., Becerra M. C. [et al.]. Comprehensive treatment of extensively drug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 2008, vol. 359, no. 6, pp. 563–574. https://doi.org/ 10.1056/NEJMoa0800106

16. Piddock L. J. V. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones: state-of-the-art 1992−1994. *Drugs*, 1995, vol. 49, suppl. 2, pp. 29–35. https://doi.org/10.2165/00003495-199500492-00006

17. Cox H., Goig G. A., Salaam-Dreyer Z., Dippenaar A., Reuter A., Mohr-Holland E. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicin-resistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2022, vol. 60, no. 3, p. e02362–21. https://doi.org/10.1128/jcm.02362-21

18. Günther G., Van Leth F., Alexandru S., Altet N., Avsar K., Bang D. [et al.]. Multidrug-resistant tuberculosis in Europe, 2010−2011. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, vol. 21, no. 3, pp. 409−416. https://doi.org/10.3201/eid2103.141343

19. Yin X., Yu Z. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin, resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China. *Journal of Infection*, 2010, vol. 61, no. 2, pp. 150–154. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.05.001

20. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O., Potapova Y., Vishnevsky B., Narvskaya O., Rastogi N. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, vol. 52, no. 8, pp. 2937–2939. https://doi.org/10.1128/AAC.00036-08

21. Bozeman L., Burman W., Metchock B., Welch L., Weiner M. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, vol. 40, no. 3, pp. 386–391. https://doi.org/10.1086/427292

Информация об авторах

Слизень Вероника Вячеславовна – канд. мед. наук, доцент. Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии (Долгиновский тракт, 157, 220080, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-1846-6100. E-mail: veronal@tut.by

Суркова Лариса Константиновна – д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии (Долгиновский тракт, 157, 220080, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: niipulm@tut.by

Гуревич Геннадий Львович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии (Долгиновский тракт, 157, 220080, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0001-5683-2322. E-mail: niipulm@tut.by

Information about the authors

Veronika V. Slizen – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-1846-6100. E-mail: veronal@tut.by

Larissa K. Surkova – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: niipulm@tut.by

Gennady L. Gurevich – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director. Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiatry (157, Dolginovski Tract, 220080, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0001-5683-2322. E-mail: niipulm@tut.by

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 616.716-007.272-053.5-07:617.51-073.756.3
https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-168-176

Поступила в редакцию 01.11.2022
Received 01.11.2022

Б. Г. Даниелова[1], Л. С. Персин[1], М. А. Постников[2], С. П. Рубникович[3], Ю. Л. Денисова[3], Н. В. Панкратова[1], А. А. Родионова[1], Е. М. Постникова[4]

[1]Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация
[2]Самарский государственный медицинский университет, Самара, Российская Федерация
[3]Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь
[4]Сеченовский университет, Москва, Российская Федерация

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗУБОЧЕЛЮСТНОЙ СИСТЕМЫ У ЛИЦ 7–15 ЛЕТ С НОРМАЛЬНОЙ ОККЛЮЗИЕЙ ПО ДАННЫМ ТЕЛЕРЕНТГЕНОГРАММ ГОЛОВЫ В БОКОВОЙ ПРОЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВНЕРОТОВЫХ ПАРАМЕТРОВ

Аннотация. Целью работы являлось изучение морфологического состояния зубочелюстной системы лиц с нормальной окклюзией зубных рядов по данным телерентгенографии с использованием внеротовых параметров.

Предложен способ оценки состояния зубочелюстной системы с использованием референтной линии PoN, линии PL, внелицевой вертикальной линии PLV и представлены схемы определения на их основании параметров, которые позволят на более качественном уровне проводить диагностику нарушений зубочелюстной системы у пациентов с аномалией окклюзии.

Определены средние значения новых параметров с использованием внеротовых параметров у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией зубных рядов. Проведенный сравнительный анализ угловых и линейных показателей телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией показал, что с возрастом тенденция их изменения идентична таковой при использовании традиционных методов.

Изученные угловые и линейные показатели телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией с использованием внеротовых параметров (линия PL и вертикальная линия PLV) рекомендованы для использования в практической работе врача-ортодонта.

Ключевые слова: нормальная окклюзия зубных рядов, телерентгенографии головы в боковой проекции, внелицевая вертикальная линия PLV

Для цитирования: Оценка состояния зубочелюстной системы у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией по данным телерентгенограмм головы в боковой проекции с использованием внеротовых параметров / Б. Г. Даниелова [др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 168–176. https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-168-176

Bella G. Danielova[1], Leonid S. Persin[1], Mikhail A. Postnikov[2], Sergey P. Rubnikovich[3], Yuliya L. Denisova[3], Natalya V. Pankratova[1], Anastasia A. Rodionova[1], Elizaveta M. Postnikova[4]

[1]A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation
[2]Samara State Medical University, Samara, Russian Federation
[3]Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus
[4]Sechenov University, Moscow, Russian Federation

ASSESSMENT OF THE STATE OF MAXILLOFACIAL SYSTEM IN PERSONS 7-15 YEARS OLD WITH NORMAL OCCLUSION ACCORDING TO CEPHALOMETRIC X-RAY USING EXTRAORAL PARAMETERS

Abstract. The aim of the work was to study the morphological state of the dentition of persons with normal occlusion according to cephalometric X-ray using extraoral parameters.

A method for assessing the state of the maxillofacial system using the PoN reference line, PL line, PLV extrafacial vertical line is proposed. Schemes for determining the parameters formed on their basis are presented as well. These parameters will allow diagnosing disorders of maxillofacial system in patients with malocclusions at a higher quality level.

The average values of the proposed new parameters were determined and presented in tables using extraoral parameters in persons 7–15 years old with normal occlusion. A comparative analysis of the angular and linear indices of cephalometric images in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion showed that with age the tendency of their change is identical to traditional methods.

The proposed and studied angular and linear indices of cephalometric images in persons 7–15 years old with normal occlusion using extraoral parameters (PL line and PLV vertical line) are recommended for use in the practical work of orthodontists.

Keywords: normal occlusion, cephalometric X-ray, PLV extrafacial vertical line
For citation: Danielova B. G., Persin L. S., Postnikov M. A., Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Pankratova N. V., Rodionova A. A., Postnikova E. M. Assessment of the state of maxillofacial system in persons 7–15 years old with normal occlusion according to cephalometric X-ray using extraoral parameters. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2023, vol. 20, no. 2, pp. 168–176 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1814-6023-2023-20-2-168-176

Введение. Ведущее место в дополнительных методах диагностики занимают лучевые, с помощью которых проводят цефалометрический анализ, представляющий собой процедуру получения и описания соотношений между функциональными единицами [1]. Этот метод позволяет изучить основание черепа, скелетную часть верхней и нижней челюсти, зубной ряд и альвеолярный отросток верхней и нижней челюсти [2–4]. Важной задачей морфометрического исследования телерентгенограмм головы в боковой проекции при аномалии окклюзии является определение диспропорции размеров и положения челюстей в различных плоскостях [5, 6].

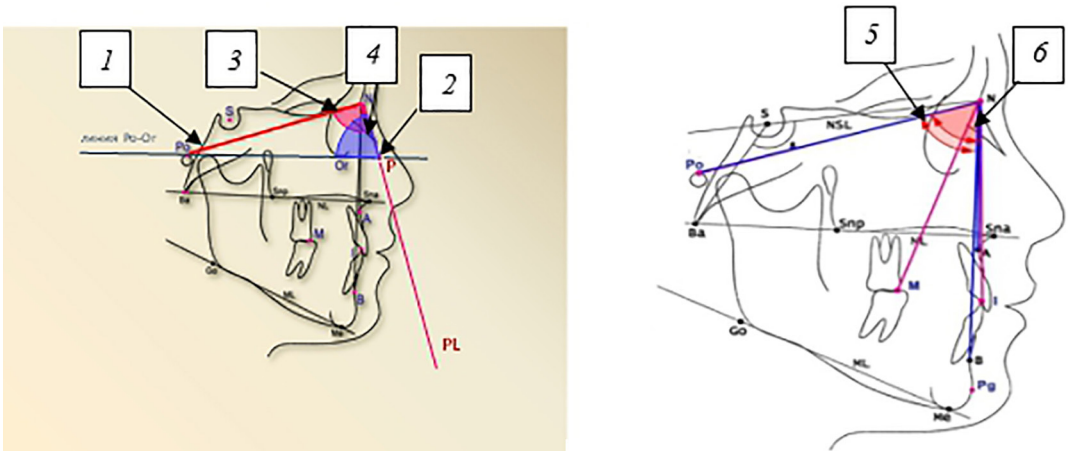
В отечественной и зарубежной литературе [7–10] методы диагностики с использованием внеротовых ориентиров головы в боковой проекции у лиц с нормальной окклюзией зубных рядов освещены недостаточно, не разработана и рекомендация к использованию диагностики с измерением параметров, связанных с внелицевой линией PLV на ТРГ головы в боковой проекции [11, 12].

Цель исследования – совершенствование методов диагностики состояния зубочелюстной системы у пациентов 7–15 лет с нормальной окклюзией зубных рядов с использованием внеротовых параметров диагностики.

Материалы и методы исследования. В ходе научного исследования обследованы 20 лиц с нормальной окклюзией в возрасте 7–15 лет, сформированы две возрастные группы – 7–12 и 12–15 лет. На основании компьютерной версии, разработанной на кафедре ортодонтии МГМСУ М. Г. Рыбаковой, Л. С. Персиным, Т. В. Репиной [5], проведена оценка развития зубочелюстной системы.

В ходе работы предложена схема построения внелицевой линии PL и вертикальной линии PLV, а также построение референтной линии PoN и схема построения точки P (пересечение перпендикуляра из точки N на линию Po-Or).

На рис. 1 представлено измерение следующих угловых параметров: NPPo – угол, характеризующий положение точки P, находящейся на пересечении линий PL и PoOr; PoNP – угол, характеризующий положение точки Po, находящейся на пересечении линий NPo и PoOr (рис. 1, *a*); PoNM – угол, характеризующий положение точки, находящейся на вершине мезиального щечного бугра первого моляра верхней челюсти, по отношению к референтной линии Po-N; PoNI –



a *b*

Рис. 1. Схема построения внелицевой линии PL, а также измерение референтной линии PoN (*1*), схема построения точки P (*2*) и измерение углов (*a* – PoNP (*3*), NPPo (*4*); *b* – PoNM (*5*), PoNI (*6*))

Fig. 1. Scheme for constructing the off-front line PL, as well as measuring the reference line PoN (*1*), scheme for plotting the point P (*2*) and measuring angles (*a* – PoNP (*3*), NPPo (*4*); *b* – PoNM (*5*), PoNI (*6*))

угол, характеризующий положение точки, находящейся на границе первой и второй трети коронки верхнего центрального резца (небной ямки), по отношению к референтной линии Po-N (рис. 1, *b*).

Показатели внеротовых параметров телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией представлены на рис. 2: OcP-PL – угол между линией окклюзионной плоскости OcP и линией PL, OcP-PLV – угол между линией окклюзионной плоскости OcP и внелицевой вертикальной линией PLV, OcP-MeGo – угол между линией окклюзионной плоскости OcP и линией основания нижней челюсти Go-Me, GoMe-PLV – угол между линией основания нижней челюсти MeGo и внелицевой вертикальной линией PLV, GoMe-PL – угол между линией основания нижней челюсти MeGo и линией Pl.

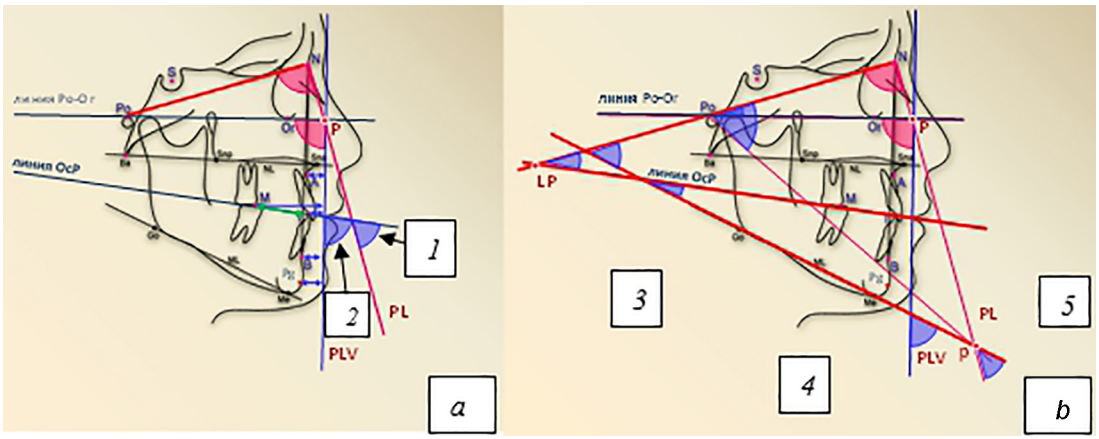


Рис. 2. Схема построения внелицевой линии PLV и измерение углов (*a* – OcP-PL (*1*), OcP-PLV (*2*); *b* – OcP-MeGo (*3*), GoMe-PLV (*4*) и GoMe-PL (*5*))

Fig. 2. Scheme of construction of the off-front PLV line and corners (*a* – OcP-PL (*1*), OcP-PLV (*2*); *b* – OcP-MeGo (*3*), GoMe-PLV (*4*) and GoMe-PL (*5*))

Помимо описанных выше угловых параметров телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией изучены линейные показатели (рис. 3).

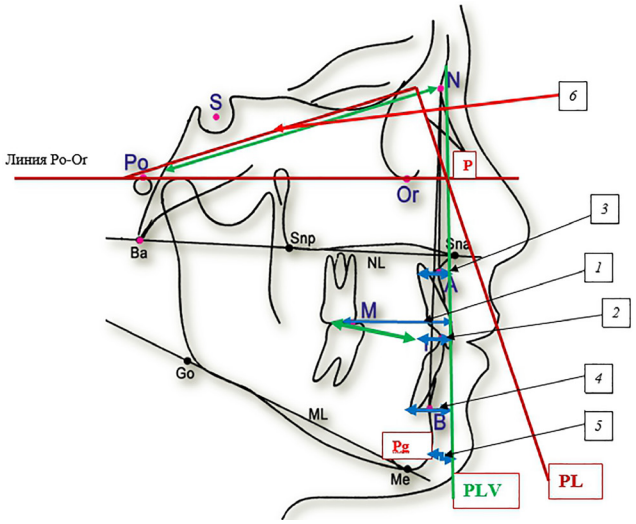


Рис. 3. Схема построения линейных параметров M-PLV (*1*), I-PLV (*2*), A-PLV (*3*), B-PLV (*4*), Pg-PLV (*5*), A-NPg, B-NPg и PoN (*6*)

Fig. 3. Scheme for constructing linear parameters M-PLV (*1*), I-PLV (*2*), A-PLV (*3*), B-PLV (*4*), Pg-PLV (*5*), A-NPg, B-NPg andPoN (*6*)

M-PLV – расстояние от точки M смыкания первых моляров до внелицевой вертикальной линии PLV, I-PLV – расстояние от точки I смыкания резцов до внелицевой вертикальной линии PLV, A-PLV – расстояние от точки передней границы альвеолярного отростка верхней челюсти до внелицевой вертикальной линии PLV, B-PLV – расстояние от точки передней границы альвеолярного отростка нижней челюсти до внелицевой вертикальной линии PLV, Pg-PLV – расстояние от точки на костном симфизе Pg до внелицевой вертикальной линии PLV, A-NPg – расстояние от точки передней границы альвеолярного отростка верхней челюсти до линии NPg лицевой плоскости, B-NPg – расстояние от точки передней границы альвеолярного отростка нижней челюсти до линии Npg лицевой плоскости, PoN – вертикальная референтная линия PoN, MI – расстояние от точки смыкания моляров M до точки смыкания резцов I (рис. 3).

M-NPg – расстояние от точки смыкания моляров до линии N-Pg лицевой плоскости, I-NPg – расстояние от точки смыкания резцов до линии N-Pg лицевой плоскости, Sto-Npg – расстояние от точки смыкания губ sto до линии N-Pg лицевой плоскости, M-APg – расстояние от точки смыкания моляров до линии A-Pg дентальной плоскости, I-APg – расстояние от точки смыкания резцов до линии A-Pg дентальной плоскости, B-APg – расстояние от точки передней границы апикального базиса нижней челюсти до линии A-Pg дентальной плоскости, Sto-APg – расстояние от точки смыкания губ sto до линии A-Pg дентальной плоскости (рис. 4).

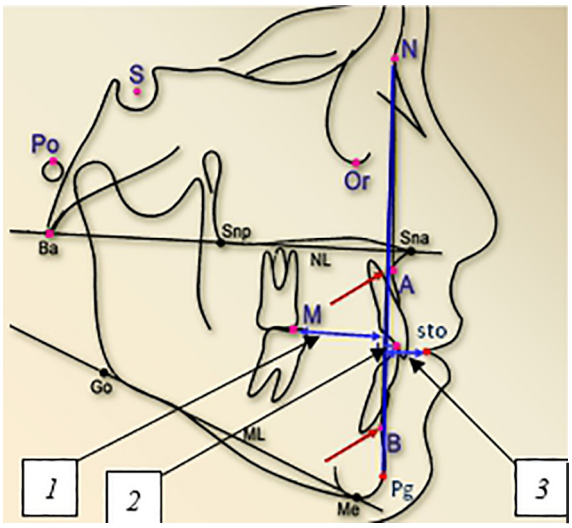


Рис. 4. Схема построения линейных параметров M-NPg (*1*), I-NPg (*2*), Sto-NPg (*3*), M-APg, I-APg, B-APgи Sto-APg

Fig. 4. Scheme for constructing linear parameters M-NPg (*1*), I-NPg (*2*), Sto-NPg (*3*), M-APg, I-APg, B-APg and Sto-APg

Определены средние значения предлагаемых параметров у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией.

Проведен статистический анализ цифровых данных обследования двух групп лиц в возрасте 7–12 и 12–15 лет с использованием программ Statistica 8.0 и Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. Проведено обследование лиц в возрасте 7–15 лет с нормальной окклюзией зубных рядов и дана оценка морфологического состояния зубочелюстной системы. Изучены угловые и линейные показатели телерентгенограмм головы в боковой проекции с использованием предложенных нами внеротовых параметров, которые рекомендованы в качестве средних значений нормы. Полученные средние значения угловых параметров и их сравнительная характеристика у лиц с нормальной окклюзией представлены в табл. 1 и на рис. 1, *а*.

Т а б л и ц а 1. **Средние значения угловых параметров (в град.) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией**

T a b l e 1. **Average values of the angular parameters (in deg) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion**

Показатель	NPPo	NPoP	PoNM	PoNI
7–12 лет (M1)	76,2 ± 0,7	15,0 ± 0,5	38,3 ± 0,6	71,8 ± 0,7
12–15 лет (M2)	76,1 ± 0,6	21,7 ± 0,8	49,2 ± 0,7	76,1 ± 0,7
Отличие M2 от M1, %	–0,13	44,7	28,5	5,9
Достоверность различий	$p = 0,08$, $p > 0,05$	$p = 7,13$, $p < 0,001$	$p = 11,8$, $p < 0,001$	$p = 4,38$, $p < 0,001$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2–4 за 100 % приняты цифровые значения, определенные у лиц 7–12 лет.

При сравнительном анализе угловых параметров установлено, что с возрастом угол NPPo не изменяется, тогда как углы NPoP, PoNM и PoNI с высокой степенью достоверности интенсивно с увеличиваются на 4,38–11,8 % ($p < 0,001$) (рис. 5).

Следующие угловые параметры телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией представлены в табл. 2.

Углы OcP-PL, OcP-PLV и GoMe-PLV у лиц 12–15 лет с нормальной окклюзией достоверно больше на 8,0–9,3 %, чем у лиц 7–12 лет ($p < 0,01$, $p < 0,001$). В то же время угол OcP-MeGo достоверно уменьшается с возрастом на 18,2 % ($p < 0,05$), а угол GoMe-PL имеет недостоверные изменения с возрастом (рис. 6).

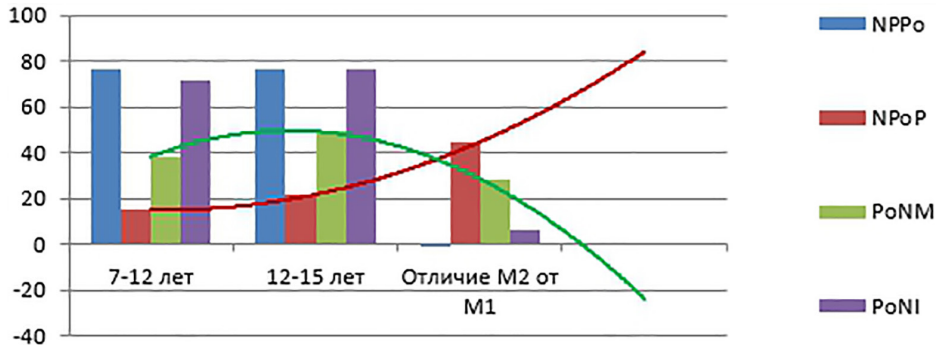


Рис. 5. Средние значения угловых параметров (в град.) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией и их отличие

Fig. 5. Mean values of the angular parameters (in deg) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 years old and 12–15 years old with normal occlusion and their difference

Т а б л и ц а 2. **Средние значения угловых параметров (в град.) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией**

T a b l e 2. **Mean values of the angular parameters (in deg) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion**

Показатель	OcP-PL	OcP-PLV	OcP-MeGo	GoMe-PLV	GoMe-PL
7–12 лет (M1)	62,0 ± 0,9	75,8 ± 0,9	17,0 ± 0,8	61,0 ± 1,1	46,6 ± 0,8
12–15 лет (M2)	67,5 ± 0,6	81,9 ± 0,8	13,9 ± 1,1	66,7 ± 1,2	48,0 ± 1,3
Отличие M2 от M1, %	8,8	8,0	–18,2	9,3	3,0
Достоверность различий	$p = 5,1$, $p < 0,001$	$p = 5,1$, $p < 0,001$	$p = 2,3$, $p < 0,05$	$p = 3,5$, $p < 0,01$	$p = 0,9$, $p > 0,05$

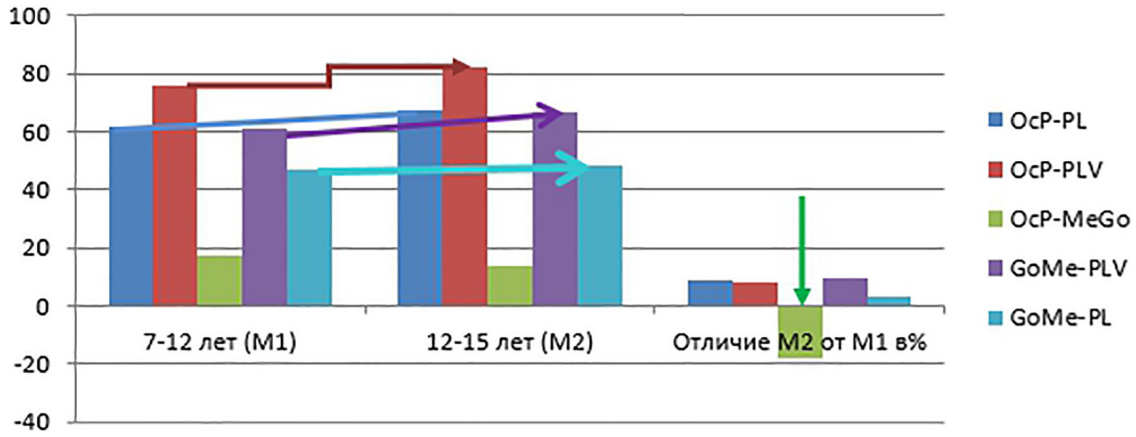


Рис. 6. Средние значения угловых параметров (в град.) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией и их отличие

Fig. 6. Mean values of the angular parameters (in deg) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 years old and 12–15 years old with normal occlusion and their difference

Проанализированы также предложенные нами линейные параметры телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией и их значения (табл. 3).

Как следует их табл. 3, все представленные показатели линейных параметров телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией с возрастом достоверно уменьшаются с 4,2 до 45,4 % ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Кроме величины расстояний A-NPg, B-NPg они не изменяются (рис. 7).

Т а б л и ц а 3. **Средние значения линейных параметров (в мм) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией**

T a b l e 3. **Mean values of the linear parameters (in mm) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion**

Показатель	M-PLV	I-PLV	A-PLV	B-PLV	Pg-PLV	A-NPg	B-NPg	Po-N
7–12 лет (M1)	47,6 ± 0,8	10,7 ± 0,8	11,0 ± 0,8	22,2 ± 0,9	22,0 ± 1,2	4,1 ± 0,6	2,9 ± 0,5	107,6 ± 0,8
12–15 лет (M2)	43,3 ± 0,9	7,7 ± 0,7	6,0 ± 1,1	14,8 ± 0,9	14,1 ± 0,7	4,1 ± 0,6	2,4 ± 0,4	103,1 ± 1,1
Отличие M2 от M1, %	–9,0	–28,0	–45,4	–33,3	–35,9	–	–17,2	–4,2
Достоверность различий	$p = 3,6$ $p < 0,01$	$p = 2,7$ $p < 0,05$	$p = 3,7$ $p < 0,01$	$p = 5,8$ $p < 0,001$	$p = 5,7$ $p < 0,001$	– –	$p = 0,8$ $p > 0,05$	$p = 3,3$ $p < 0,05$

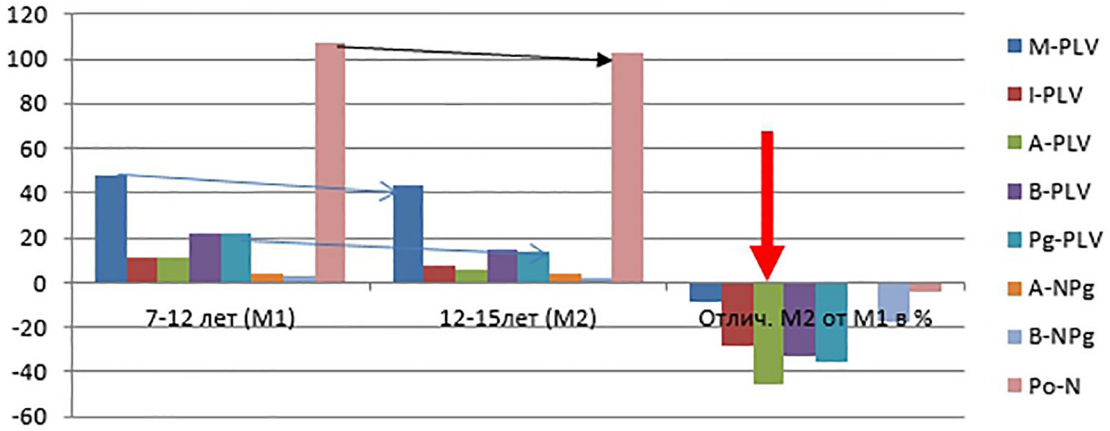


Рис. 7. Средние значения линейных параметров (в мм) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией и их отличие

Fig. 7. Mean values of the linear parameters (in mm) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion and their difference

Т а б л и ц а 4. **Средние значения линейных параметров (в мм) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией**

T a b l e 4. **Mean values of the linear parameters (in mm) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion**

Показатель	M-I	M-NPg	I-NPg	Sto-NPg	M-APg	I-APg	B-APg	Sto-APg
7–12 лет (M1)	39,4 ± 0,6	31,6 ± 0,5	6,3 ± 0,7	12,7 ± 0,5	33,2 ± 0,4	5,3 ± 0,5	3,66 ± 0,4	14,6 ± 0,4
12–15 лет (M2)	37,8 ± 0,6	28,8 ± 0,7	6,2 ± 0,4	15,6 ± 0,7	34,9 ± 0,7	3,9 ± 0,5	3,7 ± 0,4	13,1 ± 0,4
Отличие M2 от M1, %	–4,1	–8,9	–1,6	22,8	5,1	–26,4	1,1	–10,2
Достоверность различий	$p = 1,9$ $p > 0,05$	$p = 3,3$ $p < 0,05$	$p = 0,12$ $p > 0,05$	$p = 3,4$ $p < 0,05$	$p = 1,97$ $p < 0,05$	$p = 2,0$ $p < 0,05$	$p = 0,1$ $p > 0,05$	$p = 2,7$ $p < 0,05$

У лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией величина расстояний M-I, I-NPg и B-APg не достоверны, отрицательны и незначительны ($p > 0,05$). Линейные параметры M-NPg, I-APg и Sto-APg с возрастом достоверно уменьшаются на 8,9; 26,4 и 10,2 % соответственно ($p < 0,05$), а расстояния Sto-NPg и M-APg увеличиваются достоверно на 22,8 и 5,1 % ($p < 0,05$) (рис. 8).

Таким образом, при сравнительном анализе угловых параметров установлено, что с возрастом углы NPPo и GoMe-PL не изменяются, тогда как углы NPoP, PoNM, PoNI, OcP-PL, OcP-PLV и GoMe-PLVc высокой степенью достоверности интенсивно увеличиваются на 4,38–11,8 % ($p < 0,001$), что согласуется с результатами исследования А. А. Аникиенко, Н. В. Панкратовой, Л. С. Персина (2007). В то же время угол OcP-MeGo достоверно уменьшается с возрастом на 18,2 % ($p < 0,05$).

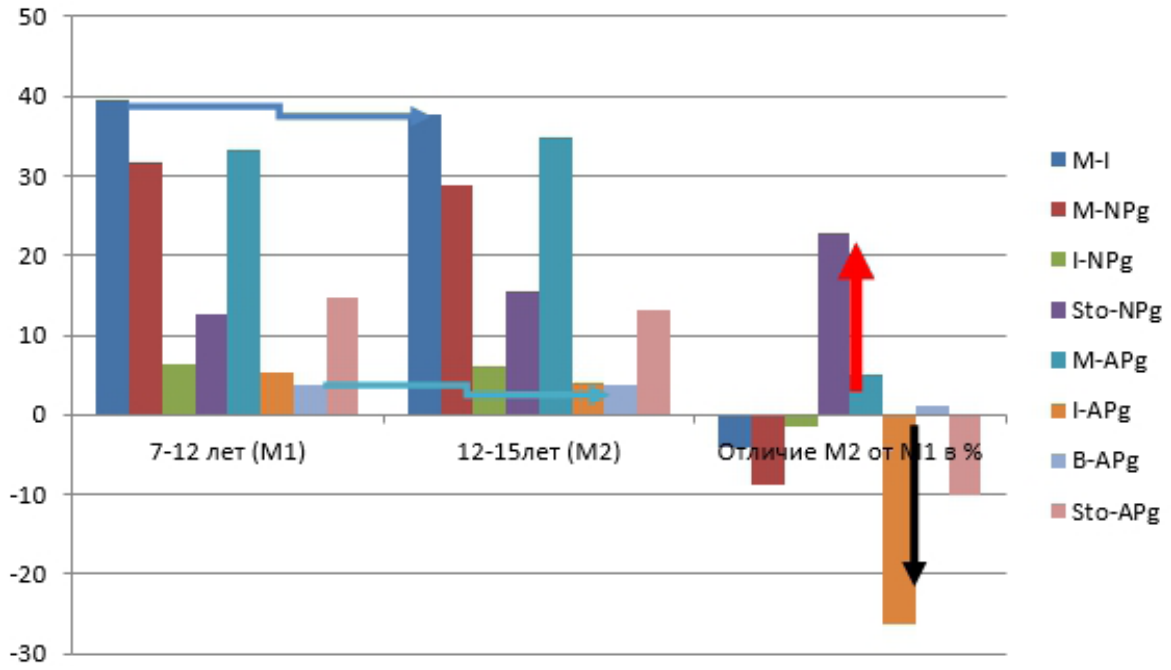


Рис. 8. Средние значения линейных параметров (в мм) телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией и их отличие

Fig. 8. Mean values of the linear parameters (in mm) of teleroentgenograms of the head in the lateral projection in persons 7–12 and 12–15 years old with normal occlusion and their difference

Показатели линейных параметров телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией M-PLV, I-PLV, A-PLV, B-PLV, Pg-PLV, Po-N, M-NPg, I-APgи Sto-APg с возрастом достоверно уменьшаются с 4,2 до 45,4 % ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Кроме величины расстояний A-NPg, B-NPg, M-I, I-NPg и B-APg они не изменяются с возрастом. Расстояния Sto-NPg и M-APg увеличиваются достоверно на 22,8 и 5,1 % ($p < 0,05$).

Выводы

1. Предложенные и изученные угловые и линейные показатели телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–15 лет с нормальной окклюзией с использованием внеротовых параметров (линия PL и вертикальная линия PLV) рекомендованы для использования в практической работе врача-ортодонта.

2. Проведенный сравнительный анализ угловых и линейных показателей телерентгенограмм головы в боковой проекции у лиц 7–12 и 12–15 лет с нормальной окклюзией показал, что с возрастом тенденция их изменения идентична таковой при использовании традиционных методов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Аникиенко, А. А. Анализ показателей возрастных изменений параметров черепа у детей 7–15 лет с разными видами окклюзии (по данным телерентгенограмм) / А. А. Аникиенко, Н. В. Панкратова, Л. С. Персин. – М. : ФГОУ «ВУНМЦ Росздрава», 2007. – 240 с.

2. Внелицевые параметры ТРГ головы в боковой проекции для оценки морфологического состояния зубочелюстной системы у пациентов с дистальной окклюзией / Б. Г. Даниелова [и др.] // Ортодонтия. – 2019. – Т. 86, № 2. – С. 37.

3. Методика анализа рентгенограмм височно-нижнечелюстного сустава / М. А. Постников [и др.] // Ортодонтия. – 2019. – Т. 88, № 4. – С. 4–9.

4. Оценка морфологического состояния зубочелюстной системы у пациентов с дистальной окклюзией зубных рядов по данным телерентгенографии / М. А. Постников [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2022. – Т. 19, № 2. – С. 178–186.

5. Оценка гармоничности смыкания зубных рядов у лиц с физиологической окклюзией / Л. С. Персин [и др.] // Ортодонтия. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 18–21.

6. Применение цефалометрического анализа в компьютерной программе Dolphin Imaging при планировании лечения пациентов с зубочелюстно-лицевыми аномалиями / М. А. Постников [и др.] // Ортодонтия. – 2017. – Т. 77, № 1. – С. 16–27.

7. Компьютерный цефалометрический анализ в программе Dolphin Imaging при планировании ортодонтического лечения / М. А. Постников [и др.] // Ортодонтия. – 2017. – Т. 79, № 3. – С. 86.

8. Цефалометрические параметры у пациентов в возрасте 9–15 лет с зубочелюстными аномалиями и детским церебральным параличом / К. Г. Поштару [и др.] // Стоматология. – 2019. – Т. 98, № 5. – С. 73–82.

9. Фадеев, Р. А. Клиническая цефалометрия / Р. А. Фадеев, А. В. Кузакова. – СПб. : МЕДИ, 2009. – 64 с.

10. Цифровые решения для стоматологической практики : учеб.-метод. пособие / Д. А. Трунин [и др.]. – Самара : ИПК «Право», 2022. – 120 с.

11. Прогноз прорезывания третьих нижних моляров в зависимости от их положения относительно «стресс-оси» / А. А. Хасболатова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2021. – Т. 18, № 4. – С. 474–482.

12. Prospects of application of cone beam computed tomography for analyzing upper respiratory tract pathologies in patients with dentition system diseases / S. P. Rubnikovich [et al.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2020. – Т. 17, № 3. – С. 346–352.

References

1. Anikienko A. A., Pankratova N. V., Persin L. S. *Analysis of indicators of age-related changes in skull parameters in children aged 7–15 years with different types of occlusion (according to teleroentgenogram data).* Moscow, All-Russian Educational, Scientific and Methodological Center for Continuous Medical and Pharmaceutical Education, 2007. 240 p. (in Russian).

2. Danielova B. G., Persin L. S., Pankratova N. V., Repina T. V., Filatova O. S. Extra-facial parameters of head TRH in lateral projection to assess the morphological state of the dentition in patients with distal occlusion. *Ortodontiya* [Orthodontics], 2019, vol. 86, no. 2, p. 37 (in Russian).

3. Postnikov M. A., Slesarev O. V., Trunin D. A., Andriyanov D. A., Gabdrafikov R. R. Technique for analysis of radiographs of the temporomandibular joint. *Ortodontiya* [Orthodontics], 2019, vol. 88, no. 4, pp. 4–9 (in Russian).

4. Postnikov M. A., Kuznetsov D. A., Rubnikovich S. P., Denisova Yu. L., Kuznetsova G. V., Pankratova N. V., Agashina A. I., Postnikova E. M. Assessment of the morphological state of the dentition in patients with distal occlusion of the dentition according to teleroentgenography. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2022, vol. 19, no. 2, pp. 178–186 (in Russian).

5. Persin L. S., Rybakova M. G., Repina T. V., Popova I. V. Evaluation of the harmony of the closure of the dentition in persons with physiological occlusion. *Ortodontiya* [Orthodontics], 2011, vol. 53, no. 1, pp. 18–21 (in Russian).

6. Postnikov M. A., Stepanov G. V., Pankratova N. V., Kirilin M. M., Malkina V. D. The use of cephalometric analysis in the Dolphin Imaging computer program when planning the treatment of patients with dentofacial anomalies. *Ortodontiya* [Orthodontics], 2017, vol. 77, no. 1, pp. 16–27 (in Russian).

7. Postnikov M. A., Stepanov G. V., Pankratova N. V., Repina T. V. Computer cephalometric analysis in the Dolphin Imaging software for orthodontic treatment planning. *Ortodontiya* [Orthodontics], 2017, vol. 79, no. 3, p. 86 (in Russian).

8. Poshtaru K. G., Postnikov M. A., Pankratova N. V., Trunin D. A., Stepanov G. V., Rodionova A. A. Cephalometric parameters in patients aged 9–15 years with dental anomalies and childhood cerebral palsy. *Stomatologiya* [Dentistry], 2019, vol. 98, no. 5, pp. 73–82 (in Russian).

9. Fadeev R. A., Kuzakova A. V. *Clinical cephalometry.* St. Petersburg, MEDI Publ., 2009. 64 p. (in Russian).

10. Trunin D. A., Postnikov M. A., Popov N. V., Nesterov A. M., Ivashchenko A. V., Vyrmaskin S. I., Palevskaya S. A. *Digital solutions for dental practice: teaching aid.* Samara, IPK "Pravo" Publ., 2022. 120 p. (in Russian).

11. Khasbolatova A. A., Pankratova N. V., Postnikov M. A., Rubnikovich S. P., Repina T. V., Kolesov M. A., Denisova Yu. L., Morozova K. M. lower molars depending on their position relative to the "stress axis". *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2021, vol. 18, no. 4, pp. 474–482 (in Russian).

12. Rubnikovich S. P., Abelskaya I. S., Denisova Yu. L., Sirak S. V., Shishov V. G. Prospects of application of cone beam computed tomography for analyzing upper respiratory tract pathologies in patients with dentition system diseases. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 3, pp. 346–652.

Информация об авторах

Даниелова Белла Гарриевна – аспирант. Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова (ул. Делегатская, 20/1, 127473, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: bellisimo2002@mail.ru

Персин Леонид Семенович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова (ул. Делегатская, 20/1, 127473, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: doktorpersin@gmail.com

Постников Михаил Александрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Самарский государственный медицинский университет (ул. Чапаевская, 89, 443099, г. Самара, Российская Федерация). https://orcid.org/0000-0002-2232-8870. E-mail: postnikovortho@yandex.ru

Рубникович Сергей Петрович – д-р мед. наук, профессор, ректор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0002-7450-3757. E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Денисова Юлия Леонидовна – д-р мед. наук, профессор. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). https://orcid.org/0000-0003-0917-7972. E-mail: denisova-yul@mail.ru

Панкратова Наталья Владимировна – канд. мед. наук, доцент. Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова (ул. Делегатская, 20/1, 127473, г. Москва, Российская Федерация). https://orcid.org/0000-0002-0672-1381. E-mail: pankratova.orto@mail.ru

Родионова Анастасия Александровна – ст. лаборант. Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова (ул. Делегатская, 20/1, 127473, г. Москва, Российская Федерация). https://orcid.id/0000-0002-8325-9602. E-mail: anastasiia.a.1611@gmail.com

Постникова Елизавета Михайловна – студент. Сеченовский университет (ул. Большая Пироговская, 19/2, 127055, г. Москва, Российская Федерация). https://orcid.org/0000-0002-5989-1704. E- mail: postnikovortho@yandex.ru

Information about the authors

Bella G. Danielova – Postgraduate student. A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (20/1, Delegatskaya Str., 127473, Moscow, Russian Federation). E-mail: bellisimo2002@mail.ru

Leonid S. Persin – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (Delegatskaya Str., 20/1, 127473, Moscow, Russian Federation). E-mail: doktorpersin@gmail.com

Mikhail A. Postnikov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Samara State Medical University (89, Chapaevskaya Str., 443099, Samara, Russian Federation). https://orcid.org/0000-0002-2232-8870. E-mail: postnikovortho@yandex.ru

Sergey P. Rubnikovich – D. Sc. (Med.), Professor, Rector. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0002-7450-3757. E-mail: rubnikovichs@mail.ru

Yuliya L. Denisova – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). https://orcid.org/0000-0003-0917-7972. E-mail: denisova-yul@mail.ru

Natalya V. Pankratova – Ph. D. (Med.), Associate Professor. A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (20/1, Delegatskaya Str., 127473, Moscow, Russian Federation). https://orcid.org/0000-0002-0672-1381. E-mail: pankratova.orto@mail.ru

Anastasia A. Rodionova – Senior laboratory assistant. A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry (20/1, Delegatskaya Str., 127473, Moscow, Russian Federation). https://orcid.id/0000-0002-8325-9602. E-mail: anastasiia.a.1611@gmail.com

Elizaveta M. Postnikova – student. Sechenov University (19/2, Bolshaya Pirogovskaya Str., 127055, Moscow Russian Federation). https://orcid.org/0000-0002-5989-1704. E- mail: postnikovortho@yandex.ru