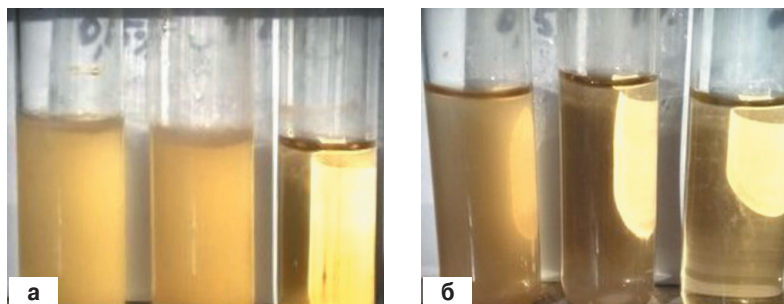


2015

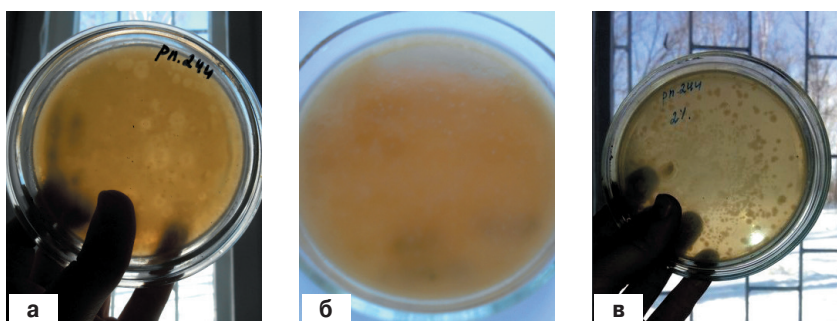


ИНФЕКЦИЯ  
И  
ИММУНИТЕТ

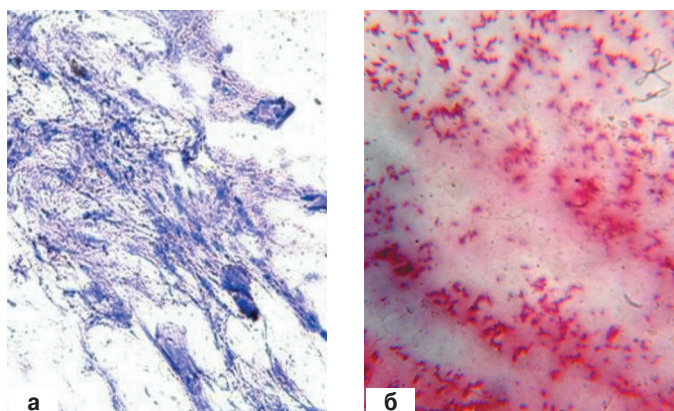
**ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ Г.Р. САДРТДИНОВОЙ «АГРЕГАЦИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOCA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА» (с. 377–381)**



**Рисунок 1. Рост на МПБ при воздействии дезинфектанта 0,5%, 1%, 2% (слева направо)**  
а) *Klebsiella pneumoniae* № 5006; б) *Klebsiella oxytoca* № 2.



**Рисунок 2. Рост *Klebsiella pneumoniae* № 244 на МПА после обработки дезинфектантом**  
а) 0,5%; б) 1%; в) 2%.



**Рисунок 3. Окраска мазков *Klebsiella pneumoniae* № 244**  
а) окраска образованной бляшки генцианвиолетом; б) окраска контроля по Граму.



# ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

октябрь–декабрь  
2015, том 5

№ 4

*Журнал издается при участии Отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов по Санкт-Петербургу и Ленинградской области*

## Главный редактор

**Жебрун А.Б.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

## Заместитель главного редактора

**Тотолян Арег А.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии и серозэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

## Редакционная коллегия

**Апт А.С.**

д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

**Барбеито Л.**

д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Монтевидео, Уругвай

**Брей П.**

д.б.н., профессор, директор Института Пастера в Лаосе, зав. лабораторией медицинской энтомологии и биологии переносчиков болезней, Вьентьян, Лаос

**Гинцбург А.Л.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

**Дозо Ч.**

д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада

**Киселев О.И.**

д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ гриппа, Санкт-Петербург, Россия

**Лобзин Ю.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия

**Лоузир Э.**

профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис

**Львов Д.К.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, Россия

**Мануссакис М.**

директор Института Пастера Греции, Афины, Греция

**Медуницын Н.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, Москва, Россия

**Михайлов М.И.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, директор Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, Москва, Россия

**Мукомолов С.Л.**

д.м.н., профессор, зав. лабораторией вирусных гепатитов Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Найденски Х.**

д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана Ангеловфа, зав. отделом инфекционной микробиологии, София, Болгария

**Онищенко Г.Г.**

д.м.н., профессор, академик РАН, помощник Председателя Правительства РФ, Москва, Россия

**Покровский В.В.**

д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель Федерального НМЦ по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва, Россия

**Сантони А.**

зам. директора по научной работе Института Пастера в Риме, профессор иммунологии и иммунопатологии отдела молекулярной медицины Университета Сапиенца в Риме, Рим, Италия

**Симбирцев А.С.**

д.м.н., профессор, директор ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Тотолян Артем А.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Фрейдлин И.С.**

д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

**Хайтов Р.М.**

д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

**Черешнев В.А.**

д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

**Шпигель А.**

д.м.н., профессор, директор Института Пастера, Дакар, Сенегал

## Редакционный совет

- Алешкин В.А.** д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия
- Бухарин О.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия
- Вишневский Б.И.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
- Долгушин И.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, ректор Южно-Уральского государственного медицинского университета, Челябинск, Россия
- Зверев В.В.** д.б.н., профессор, академик РАН, директор НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия
- Зуева Л.П.** д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
- Кафтырева Л.А.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией бактериальных кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Кашкин К.П.** д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования Минздрава РФ, Москва, Россия
- Кубарь О.И.** д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Малеев В.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, зам. директора по научной и клинической работе ЦНИИ эпидемиологии Минздрава РФ, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
- Мокроусов И.В.** д.б.н., ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Нарвская О.В.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Савичева А.М.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия
- Сельков С.А.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия
- Тец В.В.** д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
- Харит С.М.** д.м.н., профессор, руководитель отдела профилактики инфекционных заболеваний НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия
- Ценева Г.Я.** д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. лабораторией бактериальных капельных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Чекнев С.Б.** д.м.н., зам. директора по научной работе НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, зав. лабораторией межклеточных взаимодействий, Москва, Россия
- Шкарин В.В.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент Нижегородской государственной медицинской академии, зав. кафедрой эпидемиологии, Нижний Новгород, Россия

**Ответственный секретарь:** Лаврентьева И.Н., д.м.н. (Санкт-Петербург)

**Редактор перевода:** Семенов А.В., к.м.н. (Санкт-Петербург)

**Выпускающий редактор:** Мурадян А.Я., к.м.н. (Санкт-Петербург)

---

### Учредители

Северо-Западное отделение РАМН  
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера  
Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов

Журнал зарегистрирован Управлением Федеральной службы по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций по Санкт-Петербургу и Ленинградской области  
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00578 от 26 апреля 2010 г.  
Свидетельство о регистрации ПИ № ТУ 78–00910 от 24 июня 2011 г.

---

**Электронная версия журнала:** [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

**С 2012 года журнал «Инфекция и иммунитет» входит в Перечень российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук**

**С 2014 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory**

**Адрес редакции:**  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.

**Издательство НИИЭМ имени Пастера**  
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.  
Тел./факс: (812) 232-07-42.  
E-mail: [izdatelstvo@pasteurorg.ru](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

**Типография ООО «ИПК „Береста”»**  
196006, Санкт-Петербург,  
ул. Коли Томчака, 28.  
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 21.12.2015 г. Формат 60 x 90 1/8.  
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12.  
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).  
Заказ № 1358.

© Инфекция и иммунитет  
© СЗО РАМН, 2015  
© НИИЭМ имени Пастера, 2015  
© СПб РО РААКИ, 2015



# Russian Journal of Infection and Immunity (Infektsiya i immunitet)

October–December

2015, volume 5

No. 4

*The journal is published with the assistance of the Department of All-Russian Scientific and Practical Society of epidemiologists, microbiologists and parasitologists for St. Petersburg and Leningrad region*

## Editor-in-chief

**Anatolij B. Zhebrun**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute, Director, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

## Deputy editor-in-chief

**Areg A. Totolian**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg, Russian Federation

## Members of editorial board

**Alexander S. Apt**

PhD, Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation

**Luis Barbeito**

PhD, MD, Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay

**Paul Brey**

PhD, Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos

**Charles M. Dozois**

PhD, Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada

**Alexander L. Gintsburg**

PhD, MD, Professor, RAS full member, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation

**Oleg I. Kiselev**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Research Institute of Influenza, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Yuri V. Lobzin**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Childhood Infections, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Hechmi Louzir**

Professor, Institute Pasteur de Tunis, Director, Tunis, Tunisia

**Dmitry K. Lvov**

PhD, MD, Professor, RAS full member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Director, Moscow, Russian Federation

**Menelaos N. Manoussakis**

Hellenic Pasteur Institute, Director, Athens, Greece

**Nikolai V. Medunitsyn**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations, Moscow, Russian Federation

**Michael I. Michailov**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, Russian Federation

**Sergei L. Mukomolov**

PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg, Russian Federation

**Hristo Najdenski**

PhD, MD, Professor, Institute Stephan Angeloff, Director; Department of Infectious Microbiology, Head, Sofia, Bulgaria

**Gennadiy G. Onishchenko**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Assistant to the Chairman of the Government of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Vadim V. Pokrovskiy**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Central Research Institute of Epidemiology, Director, Head of the Federal AIDS Center, Moscow, Russian Federation

**Angela Santoni**

PhD, Professor, Institute Pasteur-Fondation Cenci Bolognetti, Scientific Director; Full Professor of Immunology and Immunopathology, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy

**Andre Spiegel**

PhD, MD, Professor, Institute Pasteur de Dakar, Director, Dakar, Senegal

**Andrei S. Simbirtsev**

PhD, MD, Professor, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russian Federation

**Artem A. Totolian**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

**Irina S. Freidlin**

PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Head of the Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

**Rahim M. Khaitov**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, Russian Federation

**Valery A. Chereshevn**

PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology and Physiology, Director, Yekaterinburg, Russian Federation

## Members of editorial council

- Vladimir A. Aleshkin** PhD, Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Oleg V. Bukharin** PhD, MD, Professor, RAS full member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Director, Orenburg, Russian Federation
- Boris I. Vishnevsky** PhD, MD, Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Ilija I. Dolgushin** PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Chelyabinsk State Medical Academy, Rector, Moscow, Russian Federation
- Vitaly V. Zverev** PhD, Professor, RAS full member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation, Director; I.M. Sechenov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Moscow, Russian Federation
- Ludmila P. Zueva** PhD, MD, Professor, I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, St. Petersburg, Russian Federation
- Lydia A. Kaftyreva** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
- Kirill P. Kashkin** PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Head of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
- Olga I. Kubar** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Victor V. Maleev** PhD, MD, Professor, RAS full member, Central Research Institute of Epidemiology, Deputy Director on Science, Moscow, Russian Federation
- Igor V. Mokrousov** PhD, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Microbiology, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Olga V. Narvskaya** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Alevtina M. Savicheva** PhD, MD, Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
- Sergei A. Selkov** PhD, MD, Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
- Viktor V. Tets** PhD, MD, Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
- Susanna M. Kharit** PhD, MD, Professor, Institute of Childhood Infections, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
- Galina Ya. Tseneva** PhD, MD, Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Respiratory Infections, St. Petersburg, Russian Federation
- Sergei B. Cheknev** PhD, MD, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Intracellular Interactions, Moscow, Russian Federation
- Vyacheslav V. Shkarin** PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, State Medical Academy, President, Head of the Department of Epidemiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

**Assistant editor:** Irina N. Lavrentieva (St. Petersburg)

**Translation editor:** Alexander V. Semenov (St. Petersburg)

**Copy editor:** Aram Ya. Muradyan (St. Petersburg)

---

### Founders

North-West Regional Branch of Russian Academy of Medical Sciences  
Saint Petersburg Pasteur Institute  
Russian Association of Allergologists and Clinical Immunologists, St. Petersburg Regional Branch (SPb RAACI)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass media in Saint Petersburg and Leningrad region  
Certificate of registration PI no. TU 78–00578 from April, 26, 2010.  
Certificate of registration PI no. TU 78–00910 from June, 24, 2011.

---

**Electronic version:** [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)

**Since 2012, the *Infection and Immunity* journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science**

**Since 2014 the *Infection and Immunity* journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database**

**Editorial office:**  
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.

**Publishing house of St. Petersburg Pasteur Institute**  
197101, St. Petersburg, Mira str., 14.  
Phone/fax: (812) 232-07-42.  
E-mail: [izdatelstvo@pasteurorg.ru](mailto:izdatelstvo@pasteurorg.ru)

**Produced at the Beresta Printing House**  
196084, Russian Federation, St. Petersburg,  
Koli Tomchaka str., 28.  
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 21.12.2015. Print format 60 x 90 1/8.  
Offset printing. Printed sheets 12.  
Circulation 2000 copies. (1<sup>st</sup> edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =  
Infektsiya i immunitet  
© North-West Regional Branch of RAMS, 2015  
© St. Petersburg Pasteur Institute, 2015  
© SPb RAACI, 2015

# СОДЕРЖАНИЕ

## Обзоры

Герасимова В.В., Левакова И.А., Бичурина М.А., Максимова Н.Р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В** ..... 297

Дмитриев А.В., Шосси М.С., Калинина О.В.

**Rgg-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ-РЕГУЛЯТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *STREPTOCOCCUS* spp.** ..... 303

## Оригинальные статьи

Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Добровольская О.А., Богомолова Е.Г., Черняева Е.Н.,  
Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С.

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТВ10.4 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*** ..... 315

Харченко Е.П.

**ИНВАРИАНТНЫЕ ПАТТЕРНЫ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА** ..... 323

Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Южалин А.Е., Рутковская Н.В., Головкин А.С.

**СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *TREM-1* С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ** ..... 331

Савченко А.А., Борисов А.Г., Анисимова Е.Н., Беленюк В.Д., Кудрявцев И.В., Решетников И.В., Квятковская С.В.,  
Цейликман В.Э., Зорин А.Н.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ  
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА НЕМАТОFLOW** ..... 339

Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Суровцева А.В., Монахова Н.Е.

**ЦИТОКИНЫ И ГЕРПЕСВИРУСЫ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ У ДЕТЕЙ** ..... 349

Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А., Козлов А.В., Мукомолов С.Л., Тотолян Арег А.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С  
ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)** ..... 359

## Краткие сообщения

Анисимов Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Иванов С.А., Сухова М.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

**СПОСОБ ОТБОРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ  
ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ МОРСКИХ СВИНОК** ..... 373

Садртдинова Г.Р.

**АГРЕГАЦИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOSA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА** ..... 377

## Некролог

**ПАМЯТИ ОЛЕГА ИВАНОВИЧА КИСЕЛЕВА** ..... 382

**Правила для авторов** ..... 383

**Авторский указатель** ..... 386

**Предметный указатель** ..... 386



# CONTENTS

## Reviews

*Gerasimova V.V., Levakova I.A., Bichurina M.A., Maksimova N.R.*

**MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF HEPATITIS B VIRUS ..... 297**

*Dmitriev A.V., Chaussee M.S., Kalinina O.V.*

**Rgg-LIKE TRANSCRIPTIONAL REGULATORS IN *STREPTOCOCCUS* spp. .... 303**

## Original articles

*Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S.*

**PRODUCTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TB10.4 RECOMBINANT PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*..... 315**

*Kharchenko E.P.*

**THE INVARIANT PATTERNS OF THE INTERNAL PROTEINS OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUSES ..... 323**

*Ponassenko A.V., Kutikhin A.G., Khutoraya M.V., Yuzhalin A.E., Rutkovskaya N.V., Golovkin A.S.*

**ASSOCIATION OF *TREM-1* GENE POLYMORPHISMS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS ..... 331**

*Savchenko A.A., Borisov A.G., Anisimova E.N., Belenyuk V.D., Kudryavtsev I.V., Reshetnikov I.V., Kvjatkovskaja S.V.,  
Cejjikman V.Je., Zorin A.N.*

**BLOOD LEUKOCYTES PHENOTYPING BY HEMATOFLOW METHOD IN PATIENTS WITH ONYCHOMYCOSIS..... 339**

*Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Surovtseva A.V., Monakhova N.E.*

**CYTOKINES AND HERPESVIRUSES IN CHILDREN WITH MULTIPLE SCLEROSIS ..... 349**

*Semenov A.V., Ostantkova Ju.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A., Kozlov A.V., Mukomolov S.L., Totolian Areg A.*

**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY FEATURES OF HEPATITIS C VIRUS ISOLATES FROM DIFFERENT REGIONS  
OF THE REPUBLIC SAKHA (YAKUTIA)..... 359**

## Short communications

*Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P.*

**SELECTION OF PHYLOGENETICALLY CLOSELY-RELATED *YERSINIA PESTIS* STRAINS DIFFERING  
IN THEIR VIRULENCE FOR GUINEA PIGS..... 373**

*Sadrtidinova G.R.*

**THE AGGREGATION OF BACTERIA *KLEBSIELLA OXYTOCA* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*  
UNDER THE INFLUENCE OF CHEMICAL FACTOR ..... 377**

## Obituary

**IN MEMORY OF OLEG I. KISELEV ..... 382**

**Instructions to Authors ..... 383**

**Author index ..... 386**

**Subject index ..... 386**

# МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В

В.В. Герасимова<sup>1</sup>, И.А. Левакова<sup>2</sup>, М.А. Бичурина<sup>2</sup>, Н.Р. Максимова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, г. Якутск, Россия

<sup>2</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Вирусный гепатит В является серьезной проблемой здравоохранения всего мира, России и ее регионов. Причиной этого является его широкая распространенность в разных этнических и географических группах, разнообразие проявления клинических форм, а также исходов. По данным ВОЗ, около 50 млн человек в мире ежегодно заражаются вирусом гепатита В. Развитие молекулярно-генетических методов исследования позволило расширить представления о биологии возбудителя. Генетическая вариабельность генома вируса гепатита В привела к появлению 10 различных географически распространенных генотипов, которые обозначены буквами от А до J. Внутри ряда генотипов выявлены субгенотипы, отличающиеся между собой на 4–8% полных геномных последовательностей. В работе дана таблица географической распространенности различных генотипов вируса гепатита В в мире. Географическое распределение генотипов вируса гепатита В тесно связано с эндемичными регионами и коренным населением, проживающим в них. Так генотипы В и С связаны с населением азиатских стран, генотипы А и D распространены среди европейских стран и в США. Генотип D является преобладающим типом среди пациентов с гепатитом В в различных регионах Турции. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов вируса гепатита В в африканских регионах показал наличие трех субгенотипов — А1, А2, А3. В странах Азии распространено шесть субгенотипов В: В1 — в Японии, В2–В5 и В7 — в Восточной Азии. Субгенотип В6 встречается среди коренных народов, проживающих в арктических регионах, в том числе на Аляске, севере Канады и в Гренландии. Генотип С имеет пять серотипов (С1–С5), которые распространены в Восточной и Юго-Восточной Азии. Генотип D также имеет пять субгенотипов (D1–D5), которые распространены в Африке, Индии, Средиземноморском регионе, Европе. Генотип F имеет четыре субгенотипа (F1–F4), которые циркулируют в Центральной и Южной Америке. Субгенотипы пока не выявлены среди генотипов E, G, H, I и J. На территории Российской Федерации циркулируют 3 генотипа вируса гепатита В (А, С, D). Среди них доминирует генотип D, распространенность которого составляет 88%.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит В, молекулярная эпидемиология, генотип, субгенотипы, вирусная нагрузка, мутации.

## MOLECULAR-EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF HEPATITIS B VIRUS

Gerasimova V.V.<sup>a</sup>, Levakova I.A.<sup>b</sup>, Bichurina M.A.<sup>b</sup>, Maksimova N.R.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov, Yakutsk, Russia

<sup>b</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

**Abstract.** Hepatitis B virus is a serious issue of public health services all over the world, particularly in Russia and its regions. The cause can be determined due to its higher incidence rate in different ethnic and geographical groups, variety of manifestation of clinical forms as well as outcomes. According to WHO data, about 50 million people in the world are annually infected with hepatitis B virus. Development of molecular-genetic methods of research has allowed to expand representations about the activator biology. Genetic variability of hepatitis B virus genome has been subject to identification of 10 various geographically widespread genotypes designated by letters from A to J. In a number of genotypes subgenotypes differing from one another on 4–8% full genome sequences are revealed. In the work a table of geographical prevalence of various genotypes

### Адрес для переписки:

Герасимова Виленна Васильевна  
677000, Россия, Республика Саха (Якутия), г. Якутск,  
ул. Кулаковского, 46, Арктический Инновационный Центр.  
Тел.: 8 (914) 223-11-67.  
E-mail: virlab@mail.ru

### Contacts:

Vilena V. Gerasimova  
677000, Russian Federation, Republic Sakha (Yakutia), Yakutsk,  
Kulakovsky str., 46, Arctic Innovative Center.  
Phone: +7 (914) 223-11-67.  
E-mail: virlab@mail.ru

### Библиографическое описание:

Герасимова В.В., Левакова И.А., Бичурина М.А., Максимова Н.Р.  
Молекулярно-эпидемиологические особенности вирусного  
гепатита В // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 297–302.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-297-302

### Citation:

Gerasimova V.V., Levakova I.A., Bichurina M.A., Maksimova N.R. Molecular-epidemiological features of hepatitis B virus // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 297–302.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-297-302

of hepatitis B virus in the world is presented. The geographic distribution of genotypes of hepatitis B virus is closely connected with endemic regions and indigenous population, living there. So the genotypes B and C are connected with the population of Asian countries, genotypes A and D are extended among European countries and in the USA. The genotype D is considered to be a prevailing type among patients with hepatitis B in several regions of Turkey. The phylogenetic analysis of nucleotide sequences of hepatitis B virus isolates in African regions has shown presence of three subgenotypes — A1, A2, A3. In the countries of Asia the following six subgenotypes B are noted: B1 in Japan, B2–B5 and B7 in East Asia Subgenotip B6 is found among indigenous population living in the Arctic regions, including Alaska, northern Canada and Greenland. The genotype C has five serotypes (C1–C5) which are extended in East and South East Asia. The genotype D, also has five subgenotypes (D1–D5) which are extended in Africa, India, the Mediterranean region, Europe. Genotype F has four subgenotypes (F1–F4) which circulate in Central and the South America. Subgenotypes are not revealed among genotypes E, G, H, I and J. In the territory of the Russian Federation the highest incidence of hepatitis B virus is noted in 3 genotypes (A, C, D). Among them the genotype D comprising 88% of them is the prevailing one.

**Key words:** hepatitis B virus, molecular epidemiology, genotypes, subgenotypes, virus loading, mutations.

Гепатит В — инфекция человека, возбудителем которой является вирус гепатита В. Характерными симптомами в клинически выраженных случаях признаны острые поражения печени и интоксикация. Однако у широко распространенного заболевания, вызываемого вирусом гепатита В, выявлено большое количество клинических проявлений и исходов [1].

Такие факторы, как генотип вируса гепатита В (ВГВ), вирусная нагрузка и специфические вирусные мутации, влияют на прогрессирование заболевания. Известно, что генотип ВГВ не только влияет на прогноз клинических исходов заболевания и эффективность лечения интерфероном.

Генетическая вариабельность генома ВГВ позволяет развиваться различным генотипам, субгенотипам и серотипам вследствие эволюции генома вируса, на который оказывают влияние многообразные селективные факторы. Сегодня определены 10 различных географически распространенных генотипов ВГВ, идентифицируемых латинскими буквами от А до J [21]. В нуклеотидной последовательности полных геномов ВГВ различных генотипов отмечены различия не менее чем на 8%. Проведенные исследования генотипов ВГВ А, В, С, D и F способствовали определению внутри них ряда субгенотипов, неидентичность полных геномных последовательностей, которых составляет от 4 до 8%. Кроме того, показано, что при одновременной инфекции, вызванной вирусами гепатита В различных генотипов, могут образовываться рекомбинантные генотипы [19, 43].

Острая инфекция, вызванная генотипами А и D ВГВ, приводит к более высокой частоте хронизации, чем вызванная генотипами В и С [30]. Пациенты с генотипами С и D, в отличие от больных с генотипами А и В, имеют более низкие показатели спонтанной сероконверсии (HBeAg в анти-HBe). Генотип С ВГВ имеет более высокую частоту мутаций в основном промоторе гена С (BCP) A1762T/G1764A и демонстрирует более высокую вирусную нагрузку, чем генотип В [30]. Аналогичным образом, генотип D имеет более высокую распространенность мутации в области (BCP) A1762T/G1764A, чем генотип А. Эти наблюдения позволяют предположить важные

различия в патогенезе инфекций, вызванных разными генотипами ВГВ. Определенные генотипы, например, С и D, могут способствовать более тяжелому течению заболеваний печени, в том числе формированию цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Кроме того, пациенты, инфицированные генотипами А и В, лучше отвечают на интерферонотерапию, чем пациенты с генотипами С и D [30].

Следовательно, определение генотипа возбудителя у пациентов с хронической ВГВ-инфекцией может помочь практикующим врачам определить лиц, подверженных риску прогрессирования заболевания, и назначить оптимальную противовирусную терапию.

В клинической картине заболевания, путях передачи вируса, характеристике каждой фазы заболевания, ответной реакции на противовирусную терапию, развитии цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы наблюдаются существенные различия, зависящие от географического положения, о чем свидетельствуют данные, полученные в Азии, Западной Европе, Северной Америке и Африке (табл.) [26].

В 1988 г. Х. Окамото и другие предложили первую генетическую классификацию для штаммов ВГВ — определение генотипа как вирусной последовательности с нуклеотидным межтипным расхождением более чем на 8% в расчете на весь геном. Позже Х. Нордер было предложено нуклеотидное расхождение на 4,2% с использованием последовательности поверхностного гена S [33]. Согласно их открытию, для каждого нового генотипа был определен тот же критерий обозначения буквами в алфавитном порядке от А до J.

Однако учитывая широкое разнообразие геномов ВГВ по всему миру, несколько авторов предложили уточнить критерии определения и описания конкретного генотипа/субгенотипа [27, 32, 38, 39].

Ф. Курбанов и др. поддержали эту идею и предложили свои рекомендации: использование целых последовательностей генома, расхождение  $\geq 7,5\%$  для обозначения генотипов и от  $> 4$  до  $< 7,5\%$  в случае субгенотипов [28]. Географическое распределение генотипов ВГВ рассматривается в тесной связи с эндемичным регионом



и коренным населением: генотипы В и С ВГВ связаны с населением азиатских стран, а генотипы А и D распространены среди европейских стран и в США [35]; генотипы Е и F обнаруживаются в странах Африканского континента и Америки (Центральная и Южная Америка) [34]. ВГВ генотипа G впервые обнаружен во Франции [40], но распространился повсеместно, а ВГВ генотипа H впервые был выявлен в Центральной Америке [13]. Высока распространенность ВГВ генотипа G в Северной и Южной Америке, особенно среди населения Мексики [37].

В Китае генотипы В, С и D ВГВ распределены следующим образом: преобладающий генотип В (67,12%), на втором месте — С (32,19%) и в незначительном проценте генотип D (0,68%) [31].

В работе французских ученых изучалась молекулярная эпидемиология инфекции ВГВ на острове Мартиника. С этой целью образцы крови у 86 инфицированных ВГВ пациентов из центральных больниц острова были ретроспективно проанализированы: прямое секвенирование области pre-S1 или pre-core/core или полное секвенирование генома, после чего был выполнен филогенетический анализ. Были выявлены генотипы: ВГВ/A1 (68,6%), ВГВ/A2 (10,5%), ВГВ D (D3 и D4) (8,1%), ВГВ/F (3,5%), а также ВГВ/E (2,3%) — в двух изолятах, выделенных от двух западноафриканских пациентов [18].

Гепатит В представляет собой важную проблему здравоохранения в странах Магриба (Алжир, Ливия, Мавритания, Марокко и Тунис). Эззикури С., Пино П., Банжеллон С. [22] изучили молекулярные особенности вирусных штаммов, циркулирующих в регионе. Анализ данных показывает, что в регионе Магриба широко распространены генотип D, подтип D7, преобладают мутации в pre-core/core области генома ВГВ.

Генотип D является преобладающим типом среди пациентов с гепатитом В в различных регионах Турции [21].

Результаты исследований, проведенных в Италии, показали следующее распределение генотипов, выделенных от больных ВГВ: 53% — генотип D, 44% — генотип А и 3% — генотип Е [23].

Филогенетическим анализом S-генных последовательностей определены генотипы Е и А ВГВ, которые распределились следующим образом: Е — 87% и А — 13% в Кот-д'Ивуаре; Е — 100% в Гане и 33% в Камеруне. Среднее и максимальное различие между нуклеотидными последовательностями ВГВ Е оказались равны 1,9 и 6,4% соответственно, что свидетельствует о большем генетическом разнообразии внутри этого генотипа, чем сообщалось ранее ( $p < 0,001$ ) [24].

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов ВГВ с Африканского континента подтвердил предположение о распространении субгенотипов А1, А2, А3 [24].

Изучение геномной гетерогенности вируса гепатита В стало одним из важнейших вопросов

**ТАБЛИЦА. ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В**

Генотип ВГВ	Географическое распространение
A	США, Центральная Африка, Индия, Северо-Западная Европа
B1	Китай, Индонезия
B2	Вьетнам
C	Восточная Азия, Корея, Китай, Япония, Тайвань, Вьетнам, Полинезия, Австралия, США
D	Россия, Среднеземноморье, Средний Восток, Индия, США
E	Западная Африка
F	США (редко), Центральная и Южная Америка, Полинезия
G	Европа, США (редко)
H	Центральная и Южная Америка
I	Вьетнам, Лаос
J	Япония

в исследованиях в Марокко [17], направленных на понимание связи между мутантами ВГВ и широким спектром клинических и патологических состояний, связанных с инфекцией ВГВ. Генотипы ВГВ были определены у 221 хронического носителя с использованием INNO-LiPA HBV анализа и ПЦР. Филогенетический анализ проводили на 70 изолятах, мультиплексный метод ПЦР использовался для подтверждения некоторых результатов генотипирования. Распределение генотипов было следующим: D — в 90,5% случаев, E — 1 случай (5,9%), и смешанные генотипы (5 A/D и 2 D/F) — 3,2% больных. ВГВ в образцах с генотипом D могут быть отнесены к D7 (63,3%), D1 (32,7%) и по 2% штаммов к D4 и D5. Все изоляты генотипа А принадлежат к А2 субгенотипу. Изоляты генотипа Е субгенотипировать не удалось. При изучении 70 исследованных штаммов в геноме мутации были обнаружены в 88,6% случаях, в том числе мутации в стоп-кодоне РС — у 40% больных, у 21,5% присутствовала смесь геномов дикого типа и мутации G1896A ВСР. В целом, мутации в области ВСР были обнаружены в 65,7% случаев [17].

В Японии генотипы В и С являются преобладающими генотипами у больных хроническим гепатитом В [42]. В целом, генотип В вируса ГВ широко распространен в странах Азии, имеет место распространение шести подтипов генотипа В: В1 — в Японии, В2–В5, В7 — в Восточной Азии. Субгенотип В6 встречается среди коренных народов, проживающих в арктических регионах, в том числе на Аляске, севере Канады и в Гренландии.

Генотип А широко распространен в странах Африки южнее Сахары (подтип А1), Северной Европе (подтип А2) и Западной Африке (подтип А3). Генотипы В и С широко распространены в Азиатско-Тихоокеанском регионе. Показатели распространенности генотипов В и С изменяются среди различных азиатских стран [29]. Напри-

мер, генотип С ВГВ является более распространенным, чем генотип В в Китае, Японии и Корее, в то время, как генотип В является более распространенным генотипом в Тайване и Вьетнаме [30]. Особо следует отметить тот факт, что почти все больные хроническим гепатитом В в Корее инфицированы генотипом С [29].

Генотип С, имеющий подтипы С1–С5, находят в Восточной и Юго-Восточной Азии.

Генотип D, который имеет подтипы D1–D5, распространен в Африке, Индии, Средиземноморском регионе, Европе.

Распространенность генотипа E ограничивается регионом Западной Африки. Генотип F, который имеет 4 подтипа (F1–F4), циркулирует в Центральной и Южной Америке; генотип G — во Франции, Германии, США; генотип H — в Центральной Америке [20, 25]. Позднее генотип I был выделен во Вьетнаме и Лаосе [36] и генотип J — в Японии [41].

Исследования распространения отдельных генотипов вируса ГВ на территории России немногочисленны.

По результатам молекулярно-генетических исследований, проводимых в стране с участием Референс-центра по мониторингу за гепатитами, установлено, что на территории Российской Федерации циркулируют 3 генотипа вируса гепатита В (D, A, C). Из трех генотипов вируса ГВ, встречающихся на территории страны во всех федеральных округах с разными популяционными частотами, доминирует генотип D (так же, как и в Европе, Украине, Средней Азии), распространенность которого в целом по России составляет около 88% [11].

На территории Северо-Западного региона России (Санкт-Петербурге, Ленинградской области и Республике Карелия) преимущественным генотипом ВГВ является генотип D — 81,0%, доля генотипа А составляет 16,4% и микст D+A — 2,7% [3, 4].

Изучение нуклеотидных последовательностей вирусной ДНК в 143 ВГВ-положительных образцах, отобранных в 5 регионах Сибири, показало, что 130 (90,9%) из них принадлежали к генотипу D, 10 (7%) — к генотипу С, 3 (2,1%) — к генотипу А. 120 из 130 изолятов генотипа D ВГВ были отнесены к субгенотипам D1 (34,3%), D2 (22,4%), D3 (27,3%), в 10 (7%) изолятах генотипа D

субгенотип не был установлен. Полученные данные говорят в пользу существования нескольких различных источников инфекции ВГВ в популяциях коренного населения Сибири [10].

Определение первичной структуры 42 изолятов ВГВ, выделенных у пациентов инфекционного отделения городской больницы г. Барнаула, показало доминирование генотипа D (97,6%) и 2,4% относились к генотипу А [2].

Данные, полученные при изучении генотипов ВГВ у коренных народностей Сибири, показали, что генотип D встречается у 98% населения, генотипы А и С — по 1% каждый [6, 7].

В Республике Саха (Якутия) у больных ХГВ были обнаружены 3 генотипа ВГВ, генотип D составил — 38%, А — 24,1%, С — 24,1%. По результатам проведенных исследований выявлена коинфекция генотипами А и D, доля которой составила 13,8%. Высокая эндемичность среди населения Якутии по гепатиту В возможно является причиной большого числа случаев инфицирования двумя генотипами одновременно, а также может быть причиной высокого риска повторного заражения [12].

Независимо друг от друга отдельными группами авторов проведено определение генотипов ВГВ у пациентов с хроническими формами НВ-вирусной инфекции. Так, С.И. Семенов и соавт. [8, 13], изучив 16 изолятов, выделенных у больных из Усть-Алданского района методом «гнездовой» ПЦР, обнаружили присутствие 3 генотипов вирусного гепатита В: А (44%), D (44%) и С (12%). В работах С.С. Слепцовой [15] определены 2 генотипа с частотой — D (66,7%), А (33,3%).

У эвенков, проживающих в Нерюнгринском районе, южной части Якутии, выделен только генотип D ВГВ [5].

По результатам выборочных исследований среди якутской популяции выявлено наличие 3-х генотипов ВГВ: генотип D — 30,9%, генотип А — 27,3%, генотип С — 24,1%, а также генотип ни А ни D — 17,7%. Данные исследований также показали наличие смешанных форм генотипов А и D, генотипов А и С в остальных случаях [14].

Таким образом, на примере возбудителя вирусного гепатита В раскрывается возможность и перспектива использования молекулярно-генетических подходов для изучения характеристики эпидемического процесса при этой инфекции.

## Список литературы/References

1. Балаян М.С., Михайлов М.И. Вирусные гепатиты: энциклопедический словарь. 2-е изд. М.: Амипресс, 1999. 302 с. [Balayan M.S., Mikhailov M.I. *Virusnye gepatity: entsiklopedicheskiy slovar* [Virus hepatitis: encyclopaedic dictionary]. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Amipress, 1999, 302 p.]
2. Баяндин Р.Б., Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Локтев В.Б., Гранитов В.М., Нетесов С.В. Частота обнаружения маркеров, генотипы вируса и факторы риска гепатита В у пациентов инфекционного отделения городской больницы Барнаула // *Инфекционные болезни*. 2007. Т. 5, № 1. С. 5–10. [Bayandin R.B., Shustov A.V., Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Loktev V.B., Granitov V.M., Netesov S.V. Frequency of detection of markers, genotypes of virus and hepatitis B risk factors at patients of the Infectious Disease Ward of the Barnaul City Hospital. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2007, vol. 5, no. 1, pp. 5–10. (In Russ.)]

3. Елпаева Е.А., Порецкова Е.А., Писарева М.А., Ковеленов А.Ю., Аликиан И.С., Гольбрайт Р.Б., Грудинин М.П., Эсауленко Е.В. Генотипическая характеристика вируса гепатита В у хронически инфицированных больных // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009. № 15. С. 55–58. [Elpaeva E.A., Poretskova E.A., Pisareva M.A., Kovelonov A.J., Alikiyan I.S., Golbreich R.B., Grudinin M.P., Esaulenko E.V. Genotypic characteristic of hepatitis B virus at chronically infected patients. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii = Far East Journal of Infectious Pathology*, 2009, no. 15, pp. 55–58. (In Russ.)]
4. Елпаева Е.А., Писарева М.М., Никитина О.Е., Кижло С.Н., Грудинин М.П., Дудаева О.П. Роль мутантных форм вируса гепатита В в прогрессирующем течении хронического гепатита В // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2014. № 6. С. 41–46. [Elpaeva E.A., Pisareva M.M., Nikitina O.E., Kizhlo S.N., Grudinin M.P., Dudaeva O.P. A role of mutant forms of hepatitis B virus in advanced chronic hepatitis B. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta = Proceedings of Petrozavodsk State University*, 2014, no. 6, pp. 41–46. (In Russ.)]
5. Зотова А.В., Попова О.Е., Кюрегян К.К., Исаева О.В., Михайлов М.И. Распространенность вирусных гепатитов В и С среди оленеводов-кочевников в Республике Саха (Якутия) // Медицинская вирусология. 2007. Т. XXIV. С. 181–186. [Zotova A.V., Popova O.E., Kjuregyan K.K., Isaeva O.V., Mihajlov M.I. Prevalence of virus hepatitis B and C among reindeer breeders-nomads in the Republic Sakha (Yakutia). *Meditinskaya virusologiya = Medical Virology*, 2007, vol. 24, pp. 181–186. (In Russ.)]
6. Кочнева Г.В., Мануйлов В.А., Нетесова И.Г., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Нетесов С.В. Генотипы и субтипы изолятов вируса гепатита В на территории Сибири // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 3 (109). С. 31–35. [Kochneva G.V., Manuilov V.A., Netesova I.G., Chub E.V., Bayandin R.B., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Netesov S.V. Genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus isolates in the territory of Siberia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 3 (109), pp. 31–35. (In Russ.)]
7. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Шустов А.В., Гаврилова И.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Терновой В.А., Чаусов Е.В., Акинфеева Л.А., Гранитов В.М., Сахарова Е.Г., Губанова Л.И., Орловский В.Г., Нетесов С.В. Этиология острых гепатитов и генотипическое разнообразие вирусов гепатитов А, В, С и Е в трех регионах Сибири // Инфекционные болезни. 2005. Т. 3, № 1. С. 26–31. [Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Shustov A.V., Gavrilova I.V., Chub E.V., Bayandin R.B., Ternova V.A., Chausov E.V., Akinfeeva L.A., Granitov V.M., Saharova E.G., Gubanov L.I., Olovskiy V.G., Netesov S.V. Etiology of acute hepatitis and genotypic variety of hepatitis A, B, C and E viruses in three regions of Siberia. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2005, vol. 3, no. 1, pp. 26–31. (In Russ.)]
8. Кузин С.Н., Забелин Н.Н., Самохвалов Е.И., Семенов С.И., Павлов Н.Н., Терехова М.В., Зверьяева И.К., Кузина Л.Е., Кожевников А.А. Генетическое разнообразие вируса гепатита В на территории Республики Саха (Якутия) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2008. № 5. С. 10–15. [Cuzin S.N., Zabelin N.N., Samohvalov E.I., Semenov S.I., Pavlov N.N., Terekhova M.V., Zveryaeva I.K., Kuzina L.E., Kozhevnikov A.A. Genetic variety of hepatitis B virus in the territory of Republic Sakha (Yakutia). *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination*, 2008, no. 5, pp. 10–15. (In Russ.)]
9. Мануйлов В.А., Чуб Е.В., Нетесова И.Г. Различная встречаемость субгенотипов вируса гепатита В и субтипов HBsAg у коренного населения Сибири // Мир вирусных гепатитов. 2007. № 4. С. 9–10. [Manuilov V.A., Chub E.V., Netesova I.G. Various occurrence of subgenotypes of hepatitis B virus and subtypes HBsAg at indigenous population of Siberia. *Mir virusnykh gepatitov = The World of Virus Hepatitis*, 2007, no. 4, pp. 9–10. (In Russ.)]
10. Мануйлов В.А., Осипова Л.П., Нетесова И.Г., Чуб Е.В. Распространенность различных генотипов и субтипов HBs-антигена вируса гепатита В в группах коренного населения Сибири // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015. № 1. С. 28–35. [Manuilov V.A., Osipova L.P., Netesova I.G., Chub E.V. Prevalence of various genotypes and subtypes HBs-antigen of hepatitis B virus in groups of indigenous population of Siberia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2015, no. 1, pp. 28–35. (In Russ.)]
11. О мероприятиях, направленных на стабилизацию заболеваемости парентеральными вирусными гепатитами в Российской Федерации // Постановление Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации. № 9 от 11 марта 2013 г. [O meropriyatiyakh, napravlennykh na stabilizatsiyu zabolevaemosti parenteral'nymi virusnymi gepatitami v Rossiyskoy Federatsii] [On measures directed on prevention of parenteral virus hepatitis in the Russian Federation]. *The Decision of the chief state health officer of the Russian Federation*, no. 9, March of 11th, 2013. (In Russ.)]
12. Рафаилова М.А., Слепцова С.С., Федосеева Л.Р., Алексеева М.А. Генотипы HBV в Республике Саха (Якутия) с учетом клинической формы заболевания // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2005. № 7. С. 14–19. [Rafailova M.A., Sleptsova S.S., Fedoseeva L.R., Alekseeva M.A. HBV genotypes in the Republic Sakha (Yakutia) in respect to the disease clinical form. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii = Far East Journal of Infectious Pathology*, 2005, no. 7, pp. 14–19. (In Russ.)]
13. Семенов С.И., Павлов Н.Н., Кривошапкин В.Г. Генотипы вируса гепатита В и субтипы HBsAg в Якутии // Якутский медицинский журнал. 2009. № 2 (26). С. 114–117. [Semenov S.I., Pavlov N.N., Krivoshapkin V.G. Genotypes of hepatitis B virus and HBsAg subtypes in Yakutia. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal = The Yakutsk Medical Journal*, 2009, no. 2 (26), pp. 114–117. (In Russ.)]
14. Семенов С.И., Кривошапкин В.Г., Саввин Р.Г., Индеева Л.Д., Павлов Н.Н. Хронические вирусные гепатиты В, С и D в условиях Крайнего Севера. Якутск: Триада, 2003. 119 с. [Semenov S.I., Krivoshapkin V.G., Savvin R.G., Indeeva L.D., Pavlov N.N. *Khronicheskie virusnye gepatity V, S i D v usloviyakh Kraynego Severa* [Chronic virus hepatitis B, C and D in the conditions of the Far North]. *Yakutsk: Triad*, 2003. 119 p.]
15. Слепцова С.С. Роль генотипов вирусов гепатитов В, С и D в развитии первичного рака печени // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4, № 4. С. 67–73. [Sleptsova S.S. A role of genotypes of hepatitis B, C and D viruses in development of liver primary cancer. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV-infection and Immune Suppressions*, 2012, vol. 4, no. 4, pp. 67–73. (In Russ.)]
16. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnus L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, pp. 2059–2073. doi: 10.1099/0022-1317-83-8-2059
17. Baha W., Ennaji M.M., Lazar F., Melloul M., El Fahime E., El Malki A., Bennani A. HBV genotypes prevalence, precore and basal core mutants in Morocco. *Infect. Genet. Evol.*, 2012, vol. 12, no. 6, pp. 1157–1162. doi: 10.1016/j.meegid.2012.04.026
18. Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., Césaire R., Gordien E. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.*, 2013, vol. 94, pp. 2318–2329. doi: 10.1099/vir.0.055459-0
19. Cui C., Shi J., Hui L., Xi H., Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, pp. 2773–2777. doi: 10.1099/0022-1317-83-11-2773



20. Datta S. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Viol. J.*, 2008, vol. 5, p. 156. doi: 10.1186/1743-422X-5-156
21. Emekdas G., Tezcan S., Aslan G., Serin M.S., Sezgin O., Uçbilek E., Ülger M., Altıntaş E., Döğen A. Determination of hepatitis B virus genotypes in chronic hepatitis B patients in Mersin province, Turkey. *Mikrobiyol. Bul.*, 2012, vol. 46, no. 3, pp. 432–445.
22. Ezzikouri S., Pineau P., Benjelloun S. Hepatitis B virus in the Maghreb region: from epidemiology to prospective research. *Liver Int.*, 2013, vol. 33, no. 6, pp. 811–819. doi: 10.1111/liv.12135
23. Ferraro D., Urone N., Pizzillo P., Gussio M., Magliocco S., Cacopardo B., Craxi A., Di Marco V., Di Stefano R. Phylogenetic analysis of isolates from new cases of HBV infection in Southern Italy. *Infect. Genet. Evol.*, 2012, vol. 12, no. 8, p. 1591. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.006
24. Forbi J.C., Ben-Ayed Y., Xia G.L., Vaughan G., Drobeniuc J., Switzer W.M., Khudyakov Y.E. Disparate distribution of hepatitis B virus genotypes in four sub-Saharan African countries. *J. Clin. Virol.*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 59–66.
25. Kao J.H., Chen D.S. HBV genotypes: epidemiology and implications regarding natural history. *Curr. Hepat. Rep.*, 2006, vol. 5, pp. 5–13.
26. Kim B.K., Revill P.A., Ahn Sh. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.*, 2011, vol. 16, no. 8, pp. 1169–1186. doi: 10.3851/IMP1982
27. Kramvis A., Kew M., François G. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*, 2005, vol. 23, pp. 2409–2423. doi:10.1016/j.vaccine.2004.10.045
28. Kurbanov F., Tanaka Y., Mizokami M. Geographical and genetic diversity of the human hepatitis B virus. *Hepatol. Res.*, 2010, vol. 40, pp. 14–30. doi: 10.1111/j.1872-034X.2009.00601.x
29. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. *J. Biomed. Sci.*, 2008, vol. 15, pp. 137–145.
30. Lin C.L., Kao J.H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011, suppl. 1, pp. 123–130. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06541.x
31. Ma M., He M., Liao L., Guo Y., Yu D., Xiong Z., Liu Y., Zeng P., Liao P. Molecular epidemiology and population dynamics of hepatitis B virus in Dianjiang County, Chongqing, China. *Arch. Virol.*, 2014, vol. 159, no. 1, pp. 117–124. doi: 10.1007/s00705-013-1765-9
32. Miyakawa Y., Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 2003, vol. 46, no. 6, pp. 329–338. doi:10.1159/000074988
33. Norder H., Hammas B., Löfdahl S., Couroucé A.M., Magnius L.O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73 (pt. 5), pp. 1201–1208. doi: 10.1099/0022-1317-73-5-1201
34. Norder H., Couroucé A.M., Magnius L.O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, vol. 198, pp. 489–503. doi:10.1006/viro.1994.1060
35. Okamoto H., Tsuda F., Sakugawa H., Sastrosoewignjo R.I., Imai M., Miyakawa Y., Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, 1988, vol. 69 (pt. 10), pp. 2575–2583. doi: 10.1099/0022-1317-69-10-2575
36. Phung T.B., Alestig E., Nguyen T.L., Hannoun C., Lindh M. Genotype X/C recombinant (putative genotype I) of hepatitis B virus is rare in Hanoi, Vietnam: genotypes B4 and C1 predominate. *J. Med. Virol.*, 2010, vol. 82, pp. 1327–1333. doi: 10.1002/jmv.21775
37. Roman S., Panduro A. HBV endemicity in Mexico is associated with HBV genotypes H and G. *World J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 19, no. 33, pp. 5446–5453. doi: 10.3748/wjg.v19.i33.5446
38. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J. Gastroenterol.*, 2007, no. 13, pp. 14–21.
39. Schaefer S., Magnius L., Norder H. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Intervirology*, 2009, vol. 52, pp. 323–325. doi: 10.1159/000242353
40. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F., Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.*, 2000, vol. 81, pp. 67–74. doi: 10.1099/0022-1317-81-1-67
41. Tatematsu K., Tanaka Y., Kurbanov F., Sugauchi F., Mano S., Maeshiro T., Nakayoshi T., Wakuta M., Miyakawa Y., Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, pp. 10538–10547. doi: 10.1128/JVI.00462-09
42. Uchida Y., Kouyama J.I., Naiki K., Sugawara K., Inao M., Nakayama N., Mochida S. Novel hepatitis B virus strain developing due to recombination between genotypes H and B strains isolated from a Japanese patient. *Hepatol. Res.*, 2014, vol. 44, no. 11, pp. 1130–1141. doi: 10.1111/hepr.12238
43. Wang Z., Liu Z., Zeng G., Wen S., Qi Y., Ma S., Naoumov N.V., Hou J. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. *J. Gen. Virol.*, 2005, vol. 86, pp. 985–990. doi: 10.1099/vir.0.80771-0

**Авторы:**

**Герасимова В.В.**, научный сотрудник учебно-научной лаборатории геномной медицины клиники медицинского института ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия;  
**Левакова И.А.**, зав. отделением диагностики и профилактики вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Бичурина М.А.**, д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;  
**Максимова Н.Р.**, д.м.н., профессор, руководитель учебно-научной лаборатории геномной медицины клиники медицинского института ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия.

**Authors:**

**Gerasimova V.V.**, Researcher of the University Laboratory of Genome Medicine, Clinic of Medical Institute, Northeast Federal University named after M.K. Ammosov, Yakutsk, Russian Federation;  
**Levakova I.A.**, Head of Department of Diagnostics and Prevention of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Bichurina M.A.**, PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Maksimova N.R.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the University Laboratory of Genome Medicine, Clinical of Medical Institute Federal State Independent Educational Institution of Higher Professional Education, Northeast Federal University named after M.K. Ammosov, Yakutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 10.08.2015  
 Отправлена на доработку 24.08.2015  
 Принята к печати 24.09.2015

Received 10.08.2015  
 Revision received 24.08.2015  
 Accepted 24.09.2015

# Rgg-ПОДОБНЫЕ БЕЛКИ-РЕГУЛЯТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *STREPTOCOCCUS* spp.

А.В. Дмитриев<sup>1,2</sup>, М.С. Шосси<sup>3</sup>, О.В. Калинина<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Университет Южной Дакоты, г. Вермиллион, США

<sup>4</sup> ФГБУ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова МР РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Способность патогенных и условно-патогенных бактерий выживать и размножаться в различных экологических нишах, успешно адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, колонизировать разнообразие органы и ткани и вызывать многочисленные заболевания у человека и животных, вплоть до тяжелых инвазивных поражений, обусловлено, в частности, наличием у них особых белков, обеспечивающих регуляцию транскрипции генов. В данном обзоре обобщены имеющиеся в литературе данные об Rgg-семействе (семействе TIGR01716, The Institute for Genomic Research, <http://www.jcvi.org>) белков-регуляторов транскрипции генов у ряда грамположительных бактерий с невысоким G+C составом генома: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus pyogenes*. Белки этого семейства на N-терминальном конце молекулы содержат область «спираль-поворот-спираль» (helix-turn-helix, НТН), которая связывается с промоторными областями генов и тем самым регулирует их транскрипцию. В работе обсуждены механизмы регуляции транскрипции генов, опосредованной Rgg-подобными белками, и показана значимость определенных аминокислот для проявления ими своих функциональных свойств. Rgg-подобные белки участвуют в регуляции транскрипции генов вирулентности, генов, обеспечивающих различные пути метаболизма, генов компетентности, генов, участвующих в ответе на неблагоприятные условия окружающей среды, генов, обеспечивающих образование биопленок и др. Кроме того, Rgg-подобные белки могут участвовать в реализации «чувства кворума» у бактерий. Rgg-подобные белки регулируют экспрессию не только генов, смежно расположенных с *rgg*, но и генов, расположенных в различных участках генома. Rgg-подобные белки различных бактериальных видов обладают определенной степенью гомологии, а их гены передаются, по-видимому, путем горизонтального переноса. Функциональная активность Rgg-подобных белков часто характеризуется штаммовой специфичностью, что подразумевает комплексный механизм Rgg-опосредованной регуляции транскрипции генов у грамположительных бактерий и вовлеченность этих белков в разветвленную регуляторную сеть. В работе также обсуждена роль Rgg-подобных регуляторов транскрипции в контроле вирулентных свойств грамположительных бактерий, и на примере большинства из них показана функциональная значимость этих белков в процессе взаимодействия бактерий с организмом человека. С учетом данного обстоятельства, Rgg-подобные белки (или их гены или транскрипты) могут расцениваться в качестве мишеней для создания инновационных лечебных препаратов селективного действия против различных бактериальных инфекций.

**Ключевые слова:** стрептококки, Rgg-семейство, белки-регуляторы, транскрипция генов, метаболизм, вирулентность.

---

**Адрес для переписки:**

Дмитриев Александр Валентинович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ ИЭМ.  
Тел.: 8 (812) 234-68-75. Факс: 8 (812) 234-94-89.  
E-mail: admirtiev10@yandex.ru

**Contacts:**

Alexander V. Dmitriev  
194223, Russian Federation, St. Petersburg, acad. Pavlov str., 12,  
Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-68-75. Fax: +7 (812) 234-94-89.  
E-mail: admirtiev10@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Дмитриев А.В., Шосси М.С., Калинина О.В. Rgg-подобные белки-регуляторы транскрипции генов *Streptococcus* spp. // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 303–314. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-303-314

**Citation:**

Dmitriev A.V., Chaussee M.S., Kalinina O.V. Rgg-like transcriptional regulators in *Streptococcus* spp. // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 303–314. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-303-314

Данная работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 13-04-01864а.

**Rgg-LIKE TRANSCRIPTIONAL REGULATORS IN *STREPTOCOCCUS* spp.**Dmitriev A.V.<sup>a,b</sup>, Chaussee M.S.<sup>c</sup>, Kalinina O.V.<sup>d,e</sup><sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation<sup>b</sup> St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation<sup>c</sup> University of South Dakota, Vermillion, USA<sup>d</sup> Almazov Northwest Federal Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation<sup>e</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** An ability of pathogenic bacteria to survive in different ecological niches, to successfully adapt to changing environments, to colonize different organs and tissues, and to cause numerous diseases in human and animals including severe invasive diseases is provided, in particular, by the presence of specific proteins involved in regulation of gene transcription. This review summarizes the current data on the Rgg-family (TIGR01716 family, The Institute for Genomic Research, <http://www.jcvi.org>) of regulatory proteins encoded by some of the low G+C gram positive bacteria such as *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus suis* and *Streptococcus pyogenes*. Proteins of this family has helix-turn-helix (HTH) motif at N-terminus which is able to bind promoter regions of the genes and regulate their transcription. The mechanisms of Rgg-dependent transcriptional regulation and the role of certain amino acids for functioning of Rgg-like proteins are discussed. The Rgg-like regulators have evolved to regulate diverse set of genes associated with virulence, metabolism, stress response, competence, biofilm formation, etc. The Rgg-like regulators are also involved in quorum sensing. Rgg-like proteins regulate not only the genes located adjacently to *rgg*, but also distantly located genes. Rgg-like proteins of different bacterial species have certain sequence similarity, and it is suggested that their genes are horizontally acquired. Rgg-dependent transcriptional regulation varies in a strain- and species-specific manner that supports the hypothesis of the complexity of transcriptional regulation in gram-positive bacteria. The current review also discusses the role of Rgg-like regulators in control of virulent properties of gram-positive bacteria and their interaction with human host. Given the importance of Rgg-like regulators for virulence, these proteins (their genes or transcripts) can be considered as targets for development of the novel selective agents against different bacterial infections.

**Key words:** streptococci, Rgg-family, regulatory proteins, gene transcription, metabolism, virulence.

**Введение**

В течение последних десятилетий пристальное внимание уделяется регуляции транскрипции генов, участвующих в биосинтезе и метаболизме различных субстратов, в ответе на неблагоприятные условия окружающей среды, генов вирулентности и др., у патогенных и условно-патогенных бактерий, в том числе, у грамположительных кокков — *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* и др. [1, 42]. Используя различные механизмы регуляции транскрипции генов, эти бактерии способны выживать и размножаться в различных экологических нишах, успешно адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, колонизировать разнообразные органы и ткани и вызывать многочисленные заболевания у человека и животных, вплоть до тяжелых инвазивных поражений [23, 51].

Одним из механизмов адаптации, широко распространенным среди бактерий и являющимся критически важным для их выживания в неблагоприятных условиях, является регуляция транскрипции посредством двухкомпонентных регуляторных систем, состоящих из двух белков: гистидинкиназы и ДНК-связывающего белка-регулятора [10].

Гистидинкиназа служит сенсорным белком, в молекуле которого в ответ на изменяющиеся условия окружающей среды аутофосфорилируется консервативный остаток гистидина. Далее фосфатная группа переносится на ДНК-связывающий белок-регулятор, приводя к его конформационным изменениям, в результате чего он начинает функционировать в качестве регулятора транскрипции генов (активатора или репрессора) за счет связывания с их промоторами через НТН (helix-turn-helix, «спираль-поворот-спираль») домен.

Другой способ регуляции транскрипции обеспечивается регуляторными белками (транскрипционными факторами), которые не нуждаются в сенсорных гистидинкиназах, поскольку содержат 2 домена, один из которых действует как сигнальный сенсор, а другой непосредственно взаимодействует с промоторами генов через НТН домен [10]. Такие регуляторные белки образуют гомодимеры, гомотетрамеры или гомогексамеры и часто функционируют в виде транскрипционных комплексов, включающих малые молекулы и кофакторы.

Семейство TIGR01716 (синонимичное название Rgg-семейства) регуляторов транскрипции представлено рядом белков (The Institute for Genomic Research, <http://www.jcvi.org>), которые обнаружены у представителей грамположи-

ТАБЛИЦА. Rgg-ОРТОЛОГИ У ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ С НЕВЫСОКИМ G+C СОСТАВОМ И Rgg-ПАРАЛОГИ У *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Организм	Название белка	Гомология с белком Rgg <i>Streptococcus pyogenes</i>	Наличие домена НТН (Protein Blast)	Размер белка (количество аминокислот)	Молекулярный вес, Da (расчитанный)	Регулируемые гены вирулентности, устойчивости, адаптации/свойства	Ссылка
<b>Rgg-ортологи</b>							
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Rgg/RopB	100%	N-конец	280	33 268	<i>speB, sagA, slo, nga</i> и др., вирулентность	[18, 20, 21, 22]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SPD_1952/Rgg	25%	не доказано	283	33 390	<i>trp</i> , вирулентность	[14]
<i>Streptococcus suis</i>	Rgg	20%	N-конец	287	33 480	адгезия, адаптация, гемолитическая активность	[57]
<i>Streptococcus mutans</i>	MutR	24%	N-конец	287	33 711	<i>mutAMTFEG</i> оперон	[45]
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Sag_1490/RovS	23%	N-конец	282	33,129	<i>fbsA, sodA, suI</i> оперон, вирулентность	[48]
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Sag_0239	21%	N-конец	286	33 811	нет данных	[48]
<i>Lactococcus lactis</i>	GadR	23%	N-конец	276	32 990	<i>gadBC</i> оперон, устойчивость к действию кислот	[47]
<i>Streptococcus gordonii</i>	RggD	24%	N-конец	289	33 609	нет данных	[53]
<i>Streptococcus gordonii</i>	Rgg	22%	N-конец	297	34 439	<i>gffG</i>	[54]
<i>Streptococcus sanguinis</i>	RggD	23%	N-конец	289	33 429	нет данных	[56]
<i>Streptococcus sanguinis</i>	Rgg	21%	N-конец	293	34 071	нет данных	[56]
<i>Streptococcus oralis</i>	Rgg	21%	N-конец	287	33 462	<i>gffR</i>	[27]
<i>Lactobacillus sakei</i>	LasX	27%	не доказано	285	33 566	<i>lasA-W, lasXY</i>	[46]
<b>Rgg-паралоги</b>							
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spy_0496/MutR	26%	N-конец	288	33 976	<i>sse, scpA, slo, nga, mif-3, sic</i> , вирулентность	[4, 58]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spy_0533	25%	N-конец	283	33 206	нет данных	[12]



тельных бактерий с невысоким содержанием G+C в геноме, включая молочно-кислые бактерии и листерии, но при этом не обнаружены у родов *Staphylococcus*, *Bacillus* и грамотрицательных бактерий (табл.).

Белки этого семейства состоят из 276–293 аминокислотных остатков, имеют молекулярный вес в интервале от 33 до 34,4 kDa, и выполняют функции активаторов и/или репрессоров генов. Как и все белки-регуляторы, Rgg-подобные белки имеют НТН домен, расположенный на N-терминальном конце и ответственный за связывание с промоторами и регуляцию экспрессии генов, не только смежно расположенных с *rgg*, но и генов, расположенных в различных участках генома, включая: гены вирулентности; гены, обеспечивающие различные пути метаболизма; гены, участвующие в ответе на неблагоприятные условия окружающей среды; гены, обеспечивающие образование биопленок и др. Кроме того, Rgg-подобные белки могут опосредованно влиять на экспрессию генов, будучи вовлеченными в разветвленную регуляторную сеть. У бактерий, которые содержат Rgg-подобные белки, в геноме часто присутствуют гены белков-паралогов/белков-ортологов, которые также относятся к семейству TIGR01716 (табл.).

### Rgg-подобные белки *Streptococcus gordonii*

Первый обнаруженный белок семейства TIGR01716 получил название Rgg (regulator of glucosyltransferase G gene), поскольку у *S. gordonii* он регулирует транскрипцию гена *gtfG*, кодирующего фермент гликозилтрансферазу (GtfG), который катализирует образование экстрацеллюлярных глюканов, необходимых для адгезии *S. gordonii* к поверхности зубной эмали. Гены *rgg* и *gtfG* смежно расположены, разделяются 63 п.н. и транскрибируются в одном направлении с образованием трех видов транскриптов: *rgg*, *gtfG* и *rgg-gtfG*. Предположительно белок Rgg может связываться с транскриптом *rgg-gtfG* с целью его стабилизации, повышая экспрессию *gtfG* [54]. Инактивация гена *rgg* у *S. gordonii* уменьшает активность гликозилтрансферазы до 3% по сравнению с таковой в исходном штамме. Замена аспартата на гистидин в положении 271 (D271H) на C-терминальном конце белка Rgg существенно повышает аффинность связывания Rgg<sub>271H</sub> с промотором гена *gtfG* по сравнению с Rgg<sub>271D</sub>, однако в то же время белок Rgg<sub>271H</sub> становится не способным активировать транскрипцию *gtfG* [52]. Эти данные свидетельствуют о том, что кроме НТН домена, ответственного за связывание с промотором, C-терминальный домен Rgg белка также крайне важен для регу-

ляции транскрипции, возможно, для стабилизации молекулы или связывания с малыми молекулами или кофакторами.

Кроме белка Rgg, у *S. gordonii* обнаружены и другие белки этого семейства: IviB, RggB, RggC, RggD [53, 55]. Белок IviB, возможно вовлеченный в процесс выживания *S. gordonii*, был обнаружен во время экспериментов *in vivo* при моделировании эндокардита у кроликов. Белки RggB и RggC аннотированы при анализе полного генома штамма *S. gordonii* Challis [55].

### Rgg-подобные белки *Streptococcus agalactiae*

Среди 107 генов, участвующих в регуляции транскрипции у *S. agalactiae*, в геноме этого микроорганизма присутствуют четыре гена, кодирующие Rgg-подобные белки: Sag\_1490, Sag\_0239, Sag\_2158, Sag\_0048 [29]. Белок Sag\_1490 *S. agalactiae*, обладающий наиболее высокой степенью гомологии с белком Rgg *S. pyogenes*, получил название RovS (regulator of virulence in *S. agalactiae*), так как он влияет на вирулентные свойства *S. agalactiae* при моделировании инфекции на лабораторных мышах [48, 50]. Изогенный *rovS* мутантный штамм *S. agalactiae* характеризуется 35% увеличением степени связывания с фибриногеном и значительным увеличением адгезии к эпителиальным клеткам легких (клеточная линия A549). В то же время, гемолитическая активность этого мутантного штамма ниже в 2 раза, чем активность исходного штамма [48]. Белок RovS связывается с областями ДНК в направлении 5' от оперона *cyl* (синтез гемолизина), а также генов *fbsA* (ген рецептора фибриногена), *gbs0230* (ген возможного регулятора транскрипции) и *sodA* (ген супероксиддисмутазы), увеличивая транскрипцию генов оперона *cyl*, *fbsA*, *gbs0230* и уменьшая транскрипцию *fbsA*. Предполагается, что белок RovS связывается с консервативными A+T богатыми участками ДНК. Однако, принимая во внимание, что содержание A+T в геноме *S. agalactiae* составляет 64,4–64,8% [50], в частности, в межгенных областях, представляется логичным, что RovS функционирует в качестве глобального регулятора транскрипции, и его действие не ограничивается лишь на вышеперечисленные гены. Кроме того, не исключена вероятность, что взаимодействие белка RovS с ДНК является более сложным процессом, чем предсказывается на основании экспериментов gel-shift, и для функционирования RovS необходимы дополнительные кофакторы и/или молекулы; например, короткий гидрофобный пептид, совместное действие которого с RovS значимо для проявления *S. agalactiae* вирулентных свойств [43].

## Rgg-подобные белки *Streptococcus mutans*

Rgg-подобный белок MutR *S. mutans* активирует транскрипцию смежно расположенного с геном *mutR* оперона *mutAMTFEG*, который кодирует ферменты, участвующие в синтезе лантибиотика мутаина, обладающего широким спектром действия в отношении грамположительных бактерий [45]. Синтез мутаина также регулируется сигнальной системой «чувства кворума» LuxS. Инактивация гена *luxS* изменяет уровни транскрипции обоих генов (*mutR* и *mutA*) и увеличивает экспрессию гена *irvA*, кодирующего белок с высокой степенью гомологии со стрептококковыми и лактококковыми фаговыми белками. В свою очередь, белок IrvA репрессирует ген *mutR*, приводя к снижению экспрессии мутаина I [39]. У *S. mutans* есть также гомологи MutR, регулирующие синтез мутаина III [45].

## Rgg-подобный белок *Streptococcus pneumoniae*

Геном штамма *S. pneumoniae* D39 кодирует шесть Rgg-подобных белков-регуляторов транскрипции: SPD\_1952 (синонимичное название Rgg), SPD\_0144, SPD\_0939, SPD\_0999, SPD\_1518 и SPD\_0112 [14]. Транскрипция гена SPD\_1952, кодирующего Rgg, увеличивается в 11 раз в аэробных условиях по сравнению с анаэробным культивированием. При этом *rgg* мутантный штамм в аэробных условиях растет медленнее по сравнению со штаммом «дикого типа» и является более чувствительным к химическим соединениям, способным вызывать окислительный стресс у бактерий; например, активные формы кислорода и паракват (N,N'-диметил-4,4'-дипиридил дихлорид) [14]. Эти фенотипические изменения связаны с Rgg-зависимой регуляцией транскрипции гена *tpx*, кодирующего тиолпероксидазу. В бескапсульном штамме *S. pneumoniae* отсутствие экспрессии гена *rgg* снижает способность микроорганизма к образованию биопленок. При моделировании инфекции на лабораторных мышах, *rgg* мутантный штамм *S. pneumoniae* слабее диссеминирует из легких через кровотоки по сравнению со штаммом «дикого типа», доказывая, что белок Rgg играет важную роль в контроле вирулентных свойств у пневмококков [14].

## Rgg-подобные белки *Streptococcus thermophilus*

В штамме *S. thermophilus* CNRZ368 ген *rggC* обнаружен во время экспериментов по скринингу генов, участвующих в обеспечении устойчивос-

ти микроорганизма к действию менадиона — вещества, индуцирующего синтез супероксида [24, 25]. Локус *rggC* имеет две открытые рамки считывания: *rggC*<sub>1</sub> и *rggC*<sub>2</sub>. Открытая рамка считывания *rggC*<sub>1</sub> кодирует белок, имеющий 77% гомологию с С-терминальной областью белка Rgg *S. mutans*, тогда как *rggC*<sub>2</sub> — белок, имеющий 54% гомологию с N-терминальной областью того же белка. Мутантный штамм *S. thermophilus* по *rggC*<sub>1</sub> и мутантный штамм по *rggC*<sub>2</sub> проявляют различную чувствительность к окислительному стрессу: *rggC*<sub>1</sub> мутант является более устойчивым, а *rggC*<sub>2</sub> мутант — менее устойчивым к такому стрессу по сравнению со штаммом «дикого типа» [24, 25], указывая на комплексный механизм Rgg-зависимой регуляции транскрипции у *S. thermophilus*. Другой Rgg-подобный регулятор *S. thermophilus* Ster\_0316 (синонимичное название — ComR), совместно с небольшим гидрофобным пептидом (SHP), оказывают влияние на эффективность природной трансформации *S. thermophilus* и *Streptococcus salivarius* [26].

## Rgg-подобный белок *Streptococcus suis*

На уровне транскрипции, белок-регулятор Rgg влияет на экспрессию 345 генов, которые составляют примерно 15% от общего числа генов *S. suis*, включая гены, вовлеченные в процессы метаболизма углеводов, ДНК-рекомбинации, биосинтеза белков, механизмы бактериальной защиты и др. В штамме *S. suis* 05ZYH33 белок Rgg играет важную роль в адгезии и проявлении гемолитических свойств, его активность также влияет на морфологию клеток *S. suis* и характер роста культуры в жидкой питательной среде. Инактивация гена *rgg* приводит к увеличению адгезии *S. suis* к клеткам Hep-2 и повышению гемолитической активности *in vitro*. В то же время, при моделировании инфекции у поросят, инактивация *rgg* приводит к уменьшению вирулентных свойств *S. suis*. Таким образом, у *S. suis* белок Rgg функционирует в качестве глобального регулятора транскрипции генов и играет важную роль в процессе взаимодействия *S. suis* с организмом хозяина [57].

## Rgg-подобные белки *Streptococcus pyogenes*

Геном *S. pyogenes* кодирует несколько Rgg-подобных белков. У большинства штаммов с охарактеризованной полногеномной последовательностью таких белков четыре: Rgg (синонимичное название — RopB — regulator of proteinase B), Spy\_0533, Spy\_0496 (синонимичное название — MutR) и Spy\_0037. Следует отметить, что белок Rgg *S. pyogenes* менее гомологичен «своим» паралограм MutR и Spy\_0533, чем

Rgg-ортологу LasX генетически более далекого микроорганизма *Lactobacillus sakei* (табл.). Ген глобального белка-регулятора MutR присутствует у всех изученных штаммов, но функциональная активность белка MutR, как и белка Rgg *S. pyogenes* [21], характеризуется штаммовой специфичностью, в частности, в отношении регуляции экспрессии белка ингибитора комплемента Sic, внутриклеточных белков, секретируемых нуклеаз, скорости и характера роста штаммов в жидкой питательной среде и др. [3, 4, 58]. В наиболее изученном штамме SF370 (тип *emm1*) на середине логарифмической фазы роста белок MutR регулирует транскрипцию 155 генов, выполняя роль активатора транскрипции 69 генов и роль репрессора транскрипции 86 генов. На постлогарифмической фазе роста белок MutR репрессирует транскрипцию 14 генов [58]. Инактивация гена *mutR* в штамме SF370 приводит к увеличению способности *S. pyogenes* образовывать биопленки по сравнению с исходным штаммом [58]. У всех изученных штаммов (типы *emm1*, *emm12* и *emm49*), в результате инактивации гена *mutR*, адгезивные свойства *S. pyogenes* к клеткам человеческого эпителия снижаются в 3–8 раз. Мутантные по гену *mutR* штаммы либо погибают, либо существенно хуже выживают в цельной человеческой крови по сравнению с исходными штаммами, а также становятся либо авирулентными, либо их вирулентные свойства в несколько раз снижаются при моделировании стрептококковой инфекции на лабораторных животных [3, 4, 58]. Таким образом, белок MutR играет ключевую роль в контроле вирулентных свойств *S. pyogenes*.

## Строение, свойства и функции белка Rgg

Ген *rgg S. pyogenes*, кодирующий белок Rgg размером 280 аминокислотных остатков с молекулярным весом ~ 33 kDa, локализуется между генами *mf-1* и *spe* и характеризуется высокой гетерогенностью [11, 13, 15, 28, 30, 33, 34, 36, 38, 40, 49]. По сравнению с аллелью *rgg* в штамме NZ131, которая была зарегистрирована первой в базе данных GenBank, в других штаммах обнаружены синонимичные, миссенс- и нонсенс-мутации, некоторые из которых существенно влияют на опосредованную белком Rgg-регуляцию транскрипции генов [5, 12, 15, 34, 36, 44].

Природная нонсенс-мутация в гене *rgg* штамма *S. pyogenes* 5628 привела к синтезу укороченного белка Rgg (170 аминокислотных остатков вместо 280), который не способен активировать экспрессию эритрогенного токсина SpeB, а штамм с таким белком оказался менее вирулентным при внутрибрюшном и внутривенном заражении лабораторных мышей [30].

Высокая гетерогенность аллели *rgg* выявлена в штаммах, явившихся причиной тяжелых инвазивных заболеваний [12, 15]. Большинство мутаций локализовано в С-терминальной области Rgg, и лишь три — в N-терминальном НТН домене [12]. При анализе 171 инвазивного штамма типа *emm3* выявлены 19 вариантов белка Rgg [15]. Ни один из штаммов с аминокислотными заменами M1I, C22Y, G23S, E59V, N66S, I94N, V148M, N151Y, M154I, N184K, C222Y, Y224H, R226Q, C227Y, C227R, G237V, A245T, I252F и F268C не синтезировал SpeB *in vitro*, указывая, что аминокислоты в этих положениях являются функционально значимыми для активации SpeB. В пользу этого свидетельствует тот факт, что глутаминовая кислота в положении 59 (E59) присутствует во всех регуляторных белках Rgg-семейства и, вместе с цистеином в положении 22 (C22) и глицином в положении 23 (G23), входит в состав ДНК-связывающего НТН домена.

Белок Rgg *S. pyogenes* образует гомодимеры, в процесс формирования которых, по-видимому, вовлечен его С-терминальный участок [15, 36]. Для экспрессии функционально активных форм Rgg, способных активировать транскрипцию *speB*, необходимы аргинин в положении 11 (R11), серин в положении 103 (S103) и триптофан в положении 142 (W142) [34, 36]. При этом R11 и W142 являются консервативными для всех регуляторных белков Rgg-семейства. Аминокислотные остатки триптофана часто вовлечены в механизмы белок-белковых взаимодействий, и не исключено, что W142 может участвовать в образовании Rgg-белкового комплекса, необходимого для активации *speB* [36]. Как и аминокислоты C22, G23 и E59, аргинин R11 локализуется в пределах НТН ДНК-связывающего домена и, согласно компьютерному моделированию (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>), является частью солевого мостика, стабилизирующего НТН структуру.

В штамме MGAS315 (тип *emm3*) природная замена серина на пролин в положении 103 (S103P) привела к неспособности белка Rgg связываться с промотором *speB*, сохраняя, тем не менее, способность связываться с промотором гена *norA*. Из этих данных следует, что замена S103P не влияет на ДНК-связывающую способность белка Rgg, но влияет на его специфичность и/или аффинность. P103 вариант белка Rgg контролирует рост штамма MGAS315 *S. pyogenes* в минимальной питательной среде, содержащей 2% глюкозу в качестве единственного источника энергии [34], а также его вирулентные свойства, активируя их, в отличие от S103 варианта Rgg штамма NZ131 [5, 44].

Сравнительный анализ штаммов *S. pyogenes* «дикого типа» и мутантных штаммов, у кото-



рых ген *rgg* был инактивирован методом инсерционного мутагенеза, выявил многочисленные фенотипические особенности, ассоциированные с функциональной активностью белка Rgg [5, 17–22, 30, 34, 44], в том числе:

1. мутантный штамм стал более устойчив к действию пероксида по сравнению со штаммом «дикого типа» за счет увеличения уровня транскрипции гена алкилгидропероксидредуктазы *ahpCF* и ускорения процесса разложения  $H_2O_2$  [44];
2. у мутантного штамма изменились уровни экспрессии факторов патогенности, таких как: белок M, C5a пептидаза, гемолизина O (SLO) и S (SLS), стрептокиназа, эритрогенный токсин SpeB, секретируемые ДНКазы и др. [17];
3. мутантный штамм стал ферментировать аргинин во время экспоненциальной фазы роста культуры даже в присутствии высоких концентраций глюкозы [18], доказывая существенную роль Rgg в регуляции процессов катаболизма;
4. инактивация гена *rgg* повлияла на частоту индукции профага NZ131.1 [22];
5. мутантный штамм стал более вирулентным по сравнению со штаммом «дикого типа» [5, 44].

Для того, чтобы доказать, что все фенотипические изменения в *rgg* мутантных штаммах явились результатом инактивации именно гена *rgg*, а не результатом полярного эффекта или каких-либо вторичных мутаций в геноме, с использованием технологии комплементации в *rgg* мутантных штаммах *S. pyogenes* экспрессия данного гена была восстановлена под контролем как природного, так и гетерологичного плазмидного промотора. Восстановление экспрессии гена *rgg* на хромосоме под природным промотором восстанавливает фенотипические свойства мутантных штаммов до свойств «родительских» штаммов, например, уровни транскрипции генов, гемолитическую и НАД-гликогидролазную активности, метаболизм аминокислот, уровень спонтанной индукции бактериофага NZ131.1 [2]. В то же время, восстановление экспрессии гена *rgg* под гетерологичным плазмидным промотором, под действием которого уровень транскрипции *rgg* увеличивается в 2 раза по сравнению с природным промотором, не восстанавливает ни одно из фенотипических свойств. Таким образом, двукратное увеличение транскрипции гена *rgg* приводит к неспособности Rgg проявлять свои регуляторные свойства, что свидетельствует о значимости уровня транскрипции гена *rgg* для функциональной активности белка Rgg [2]. Не исключено, что при достижении в бактериальной клетке определенного уровня синтеза

Rgg, эти молекулы начинают формировать неактивные гомодимеры или гетеродимеры с другими Rgg-паралогами.

## Rgg «core»-регулон и Rgg «sub»-регулоны

Белок Rgg *S. pyogenes* экспрессируется как на экспоненциальной фазе роста культуры, так и на постэкспоненциальной, выполняя функции активатора и/или репрессора транскрипции генов, являясь глобальным белком-регулятором и оказывая влияние на многочисленные функциональные категории генов: гены метаболизма, гены вирулентности, регуляторные гены и др. [17–22]. При этом его функциональная активность зависит от фазы роста культуры. На постэкспоненциальной фазе роста белок Rgg связывается с промоторной областью гена *speB*, что приводит к образованию двух сайтов инициации транскрипции в положениях 697 п.н. и 137 п.н. в направлении 5' от старт-кодона *speB*. Исследования с использованием хроматин-иммунопреципитации и микрочипового анализа ДНК выявили, что Rgg дополнительно связывается с 65 сайтами на хромосомной ДНК *S. pyogenes* [7, 8, 34]. При этом 54% сайтов связывания располагаются в некодирующих областях ДНК в направлении 5' от генов, участвующих в вирулентности, метаболизме, репарации ДНК, генов, приобретенных посредством горизонтального переноса и др. Например, в штамме NZ131, на середине логарифмической фазы роста, белок Rgg выполняет функции активатора транскрипции 134 генов и репрессора транскрипции 165 генов, а на постлогарифмической фазе роста — активатора транскрипции 340 генов и репрессора транскрипции 227 генов [22].

Среди всех представителей семейства Rgg-подобных белков, белок Rgg *S. pyogenes* был первым белком-регулятором, функциональные свойства которого изучены с использованием микрочиповой технологии. С этой целью отобраны 4 штамма (тип *emm1* (SF370 и MGAS5005) и тип *emm49* (NZ131 и CS101)) с идентичными последовательностями белка Rgg, состав генома которых отличался в основном за счет ДНК бактериофагов. В результате инактивации гена *rgg* в этих штаммах, выявлены Rgg «core»-регулон, состоящий из гена *speB* и смежно расположенного с ним гена гипотетического белка размером 43 аминокислоты, и штаммоспецифические Rgg «sub»-регулоны, размеры которых варьируют от одного гена (*spy1793*) в штамме MGAS5005 до 704 генов в штамме NZ131 [21, 22]. Последующий анализ штаммов типа *emm3* также выявил значительные различия в количестве генов, регулируемых Rgg [15]. В частности, инактивация гена *rgg* привела к изменению



уровней транскрипции 479 генов в штамме MGAS10870 и 159 генов в штамме MGAS9937. При этом более половины генов, регулируемых Rgg в штамме MGAS9937, регулировались Rgg и в штамме MGAS10870. Определенная зависимость между количеством регулируемых Rgg-регуляторных генов и общим числом генов, регулируемых Rgg, дает основание предположить, что большинство генов, входящих в Rgg «sub»-регулоны, является результатом действия разветвленной регуляторной сети, включающей в себя белок-регулятор Rgg и другие регуляторные молекулы. Например, в штамме NZ131 белок Rgg влияет на транскрипцию регуляторных генов *covRS*, *spy1062* и *spy1106* и др. При этом Rgg «sub»-регулон NZ131 включает в себя гены, ассоциированные с *CovRS*-, *SPy1062*- и *SPy1106*-регулонами. Таким образом, чем больше количество Rgg-зависимых регуляторных генов, тем масштабнее и шире Rgg-регулон, что показано на примере штаммов NZ131, MGAS5005, SF370 и CS101 [21, 22]. Эти данные открывают широкие перспективы для дальнейшего изучения взаимодействия Rgg с другими регуляторными молекулами и понимания механизмов Rgg-зависимой регуляции транскрипции, вовлеченной в регуляторную сеть *S. pyogenes*. Аналогичные данные о существовании «core»-регулона и «sub»-регулонов получены при исследовании глобального белка-регулятора Mga (multiple gene regulator of group A streptococci) *S. pyogenes*, «core»-регулон которого состоит в основном из генов, расположенных недалеко от гена *mga* и участвующих в адаптации *S. pyogenes* к организму хозяина и проявлении вирулентных свойств [31].

Различия в Rgg «sub»-регулонах находят свое отражение на уровнях экспрессии белков, приводя к тому, что мутантные штаммы становятся более или менее вирулентными по сравнению с исходными, доказывая штаммовую специфичность Rgg-зависимой регуляции транскрипции [5, 15, 30, 33, 44].

## Необходимы ли для активности белка Rgg дополнительные молекулы или кофакторы?

Ряд фактов свидетельствуют о том, что опосредованная белком Rgg регуляция транскрипции многочисленных генов не является результатом простого непосредственного взаимодействия белка Rgg с их промоторами, в частности:

1. во время экспоненциальной фазы роста *S. pyogenes*, глюкоза репрессирует экспрессию гена *speB*, но при этом не влияет на транскрипцию гена *rgg* [37]. Результаты

коиммунопреципитации показывают, что во время экспоненциальной фазы роста активации *speB* препятствует взаимодействию Rgg с белком LacD.1 (тагатоза-1,6-бифосфатальдолаза) [35]. Не исключено, что LacD.1 является «чувствительным» к наличию конечных продуктов окисления глюкозы, которые вызывают конформационные изменения в молекуле LacD.1. Это способствует его белок-белковому взаимодействию с Rgg [35]. Истощение глюкозы в питательной среде вызывает высвобождение Rgg из комплекса с LacD.1 и активацию транскрипции *speB*;

2. штаммовая специфичность действия Rgg, находящая свое отражение в вариабельности Rgg «sub»-регулонов [21], предполагает взаимодействие Rgg с различными штаммоспецифическими белками, возможно кодируемыми профаговыми генами;
3. аминокислотные замены в белке Rgg за пределами НТН домена, приводящие к неспособности белка активировать транскрипцию *speB* [34], указывают на то, что С-терминальная область Rgg участвует во взаимодействии с кофакторами и/или другими молекулами;
4. Rgg-подобные белки взаимодействуют с циклоспорином А, образуя комплексные структуры [41];
5. у *S. pyogenes* выявлено непосредственное взаимодействие Rgg-подобных белков с небольшими гидрофобными пептидами (SHP), состоящими из 22–23 аминокислотных остатков, семейство которых недавно обнаружено у стрептококков и энтерококков [6, 16, 32]. В частности, добавление синтетических SHP влияет на способность *S. pyogenes* образовывать биопленки [16].

Все эти данные указывают на комплексный механизм Rgg-опосредованной регуляции транскрипции у *S. pyogenes*. Наиболее логичным представляется функционирование белка Rgg в составе динамического транскрипционного комплекса, характеризующегося штаммовой специфичностью и включающего в себя Rgg, ряд других белков, а также кофакторы или иные молекулы.

## Является ли белок Rgg фрагментом древнего бактериофага?

Гипотеза о том, что ген белка Rgg мог ранее локализоваться на мигрирующем генетическом элементе (бактериофаге), имеет под собой ряд оснований:

1. G+C состав гена *rgg* составляет 32%, что сходно с таковым у профаговых генов

и существенно отличается от G+C состава генов, смежно расположенных с *rgg* (37–39%), и хромосомной ДНК *S. pyogenes* в целом (39%);

2. в геноме *S. pyogenes* присутствуют гены паралогов Rgg, что может свидетельствовать о наличии древних сайтов интеграции бактериофагов;
3. белок Rgg имеет гомологию с фаговым регулятором семейства Cro/CI;
4. Rgg непосредственно связывается с участками профаговой ДНК и влияет на транскрипцию профаговых генов [9, 22].

Вполне возможно, что в ходе эволюции Rgg-подобные белки могли включиться в разветвленную регуляторную сеть *S. pyogenes* и начать регулировать не только транскрипцию фаговых генов, но и многих других генов, расположенных в различных участках генома. Таким обра-

зом, все перечисленные данные проливают свет на процесс коэволюции бактерий и бактериофагов и открывают широкие перспективы для дальнейших исследований.

## Заключение

Среди многочисленных фенотипических свойств, контролируемых белками Rgg-семейства, особо следует отметить вирулентные свойства. Учитывая, что Rgg-подобные белки, являясь глобальными белками-регуляторами транскрипции генов, часто играют ключевую роль в реализации вирулентных свойств у некоторых патогенных и условно-патогенных бактерий, Rgg-подобные белки (или их гены или транскрипты) могут расцениваться в качестве мишеней для создания инновационных лечебных препаратов.

## Список литературы/References

1. Дмитриев А.В. Регуляция транскрипции генов у стрептококков групп А и В // Медицинский академический журнал. 2010. Т. 10, № 4. С. 256–266. [Dmitriev A.V. Regulation of gene transcription in group A and B streptococci. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2010, vol. 10, no. 4, pp. 256–266. (In Russ.)]
2. Дмитриев А.В., Chaussee M.S. Зависимость свойств *Streptococcus pyogenes* от уровня транскрипции гена *rgg* // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 3. С. 114–119. [Dmitriev A.V., Chaussee M.S. Dependence of *Streptococcus pyogenes* properties from the *rgg* gene transcriptional level. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 114–119. (In Russ.)]
3. Дмитриев А.В., Рождественская А.С., Зуткис А.А., Тотолян А.А. Направленная регуляция патогенных свойств стрептококков // Медицинский академический журнал. 2009. Т. 9, № 4. С. 50–58. [Dmitriev A.V., Rozhdestvenskaya A.S., Zutkis A.A., Totolian A.A. Targeted regulation of pathogenic properties in streptococci. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 50–58. (In Russ.)]
4. Зуткис А.А., Мильман Б.Л., Дмитриев А.В. Роль гена *mutR* в метаболизме и вирулентности штаммов *Streptococcus pyogenes* генотипа *emm12* // Инфекция и иммунитет. 2014, Т. 4, № 4. С. 339–346. [Zutkis A.A., Milman B.L., Dmitriev A.V. The role of *mutR* gene in metabolism and virulence of *emm12* genotype *Streptococcus pyogenes* strains. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 4, pp. 339–346. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-339-346 (In Russ.)]
5. Рождественская А.С., Дмитриев А.В., Грабовская К.Б., Тотолян А.А. Инактивация гена регулятора транскрипции Rgg изменяет экспрессию секретируемых факторов патогенности и вирулентность *Streptococcus pyogenes* // Медицинский академический журнал. 2008. Т. 8, № 2. С. 21–27. [Rozhdestvenskaya A.S., Dmitriev A.V., Grabovskaya K.B., Totolian A.A. Inactivation of the transcription regulator gene Rgg leads to changes in the expression of secreted pathogenicity factors and the virulence of *Streptococcus*. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2008, vol. 8, no. 2, pp. 21–27. (In Russ.)]
6. Aggarwal C., Jimenez J.C., Nanavati D., Federle M.J. Multiple length peptide-pheromone variants produced by *Streptococcus pyogenes* directly bind Rgg proteins to confer transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 2014, vol. 289, no. 32, pp. 22427–22436. doi: 10.1074/jbc.M114.583989
7. Anbalagan S., Dmitriev A., McShan W.M., Dunman P.M., Chaussee M.S. Growth phase-dependent modulation of Rgg binding specificity in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 15, pp. 3961–3971. doi: 10.1128/JB.06709-11
8. Anbalagan S., McShan W.M., Dunman P.M., Chaussee M.S. Identification of Rgg binding sites in the *Streptococcus pyogenes* chromosome. *J. Bacteriol.*, 2011, vol. 193, no. 18, pp. 4933–4942. doi: 10.1128/JB.00429-11
9. Anbalagan S., Chaussee M.S. Transcriptional regulation of a bacteriophage encoded extracellular DNase (Spd-3) by Rgg in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 4:e61312. doi: 10.1371/journal.pone.0061312
10. Balleza E., López-Bojorquez L.N., Martínez-Antonio A., Resendis-Antonio O., Lozada-Chávez I., Balderas-Martínez Y.I., Encarnación S., Collado-Vides J. Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2009, vol. 33, no. 1, pp. 133–151. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x
11. Beres S., Sylva G.L., Barbian K.D., Lei B., Hoff J.S., Mammarella N.D., Liu M.Y., Smoot J.C., Porcella S.F., Parkins L.D., Campbell D.S., Smith T.M., McCormick J.K., Leung D.Y., Schlievert P.M., Musser J.M. Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 15, pp. 10078–10083. doi: 10.1073/pnas.152298499

12. Beres S.B., Carroll R.K., Shea P.R., Sitkiewicz I., Martinez-Gutierrez J.C., Low D.E., McGeer A., Willey B.M., Green K., Tyrrell G.J., Goldman T.D., Feldgarden M., Birren B.W., Fofanov Y., Boos J., Wheaton W.D., Honisch C., Musser J.M. Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107, no. 9, pp. 4371–4376. doi: 10.1073/pnas.0911295107
13. Beres S.B., Richter E.W., Nagiec M.J., Sumbly P., Porcella S.F., DeLeo F.R., Musser J.M. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A Streptococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 18, pp. 7059–7064. doi: 10.1073/pnas.0510279103
14. Bortoni M.E., Terra V.S., Hinds J., Andrew P.W., Yesilkaya H. The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg. *Microbiology*, 2009, no. 155, pt. 12, pp. 4123–4134. doi: 10.1099/mic.0.028282-0
15. Carroll R., Shelburne S.A. 3<sup>rd</sup>, Olsen R.J., Suber B., Sahasrabhojane P., Kumaraswami M., Beres S.B., Shea P.R., Flores A.R., Musser J.M. Naturally occurring single amino acid replacements in a regulatory protein alter streptococcal gene expression and virulence in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, no. 5, pp. 1956–1968. doi: 10.1172/JCI45169
16. Chang J.C., LaSarre B., Jimenez J.C., Aggarwal C., Federle M.J. Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 8:e1002190. doi: 10.1371/journal.ppat.1002190
17. Chaussee M.S., Watson R.O., Smoot J.C., Musser J.M. Identification of Rgg-regulated exoproteins of Streptococcus pyogenes. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 2, pp. 822–831. doi: 10.1128/IAI.69.2.822-831.2001
18. Chaussee M.S., Somerville G.A., Reitzer L., Musser J.M. Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in Streptococcus pyogenes. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 20, pp. 6016–6024. doi: 10.1128/JB.185.20.6016-6024.2003
19. Chaussee M.S., Sylva G.L., Sturdevant D.E., Smoot L.M., Graham M.R., Watson R.O., Musser J.M. Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in Streptococcus pyogenes. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 2, pp. 762–770. doi: 10.1128/IAI.70.2.762-770.2002
20. Chaussee M.A., Callegari E.A., Chaussee M.S. Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in Streptococcus pyogenes. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 21, pp. 7091–7099. doi: 10.1128/JB.186.21.7091-7099.2004
21. Dmitriev A.V., McDowell E.J., Chaussee M.S. Inter- and intraserotypic variation in the Streptococcus pyogenes Rgg regulon. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, vol. 284, no. 1, pp. 43–51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01171.x
22. Dmitriev A.V., McDowell E.J., Kappeler K.V., Chaussee M.A., Rieck L.D., Chaussee M.S. The Rgg regulator of Streptococcus pyogenes influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 20, pp. 7230–7241. doi: 10.1128/JB.00877-06
23. Engleberg N.C., Heath A., Miller A., Rivera C., DiRita V.J. Spontaneous mutations in the CsrRS two-component regulatory system of Streptococcus pyogenes result in enhanced virulence in a murine model of skin and soft tissue infection. *J. Infect. Dis.*, 2001, vol. 183, no. 7, pp. 1043–1054. doi: 10.1086/319291
24. Fernandez A., Thibessard A., Borges F., Gintz B., Decaris B., Leblond-Bourget N. Characterization of oxidative stress-resistant mutants of Streptococcus thermophilus CNRZ368. *Arch. Microbiol.*, 2004, vol. 182, no. 5, pp. 364–372. doi: 10.1007/s00203-004-0712-2
25. Fernandez A., Borges F., Gintz B., Decaris B., Leblond-Bourget N. The rggC locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by Streptococcus thermophilus. *Arch. Microbiol.*, 2006, vol. 186, no. 3, pp. 161–169. doi: 10.1007/s00203-006-0130-8
26. Fontaine L., Boutry C., de Frahan M.H., Delplace B., Fremaux C., Horvath P., Boyaval P., Hols P. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in Streptococcus thermophilus and Streptococcus salivarius. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 5, pp. 1444–1454. doi: 10.1128/JB.01251-09
27. Fujiwara T., Hoshino T., Ooshima T., Sobue S., Hamada S. Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from Streptococcus oralis. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 5, pp. 2475–2483. doi: 10.1128/IAI.68.5.2475-2483.2000
28. Green N.M., Zhang S., Porcella S.F., Nagiec M.J., Barbian K.D., Beres S.B., LeFebvre R.B., Musser J.M. Genome sequence of a serotype M28 strain of group A streptococcus: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J. Infect. Dis.*, 2005, vol. 192, no. 5, pp. 760–770. doi: 10.1086/430618
29. Herbert M.A., Beveridge C.J., McCormick D., Aten E., Jones N., Snyder L.A., Saunders N.J. Genetic islands of Streptococcus agalactiae strains NEM316 and 2603VR and their presence in other Group B streptococcal strains. *BMC Microbiol.*, 2005, 5:31. doi: 10.1186/1471-2180-5-31
30. Hollands A., Aziz R.K., Kansal R., Kotb M., Nizet V., Walker M.J. A naturally occurring mutation in ropB suppresses SpeB expression and reduces MIT1 group A streptococcal systemic virulence. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 12, e4102. doi: 10.1371/journal.pone.0004102
31. Hondorp E.R., McIver K.S. The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol. Microbiol.*, 2007, vol. 66, no. 5, pp. 1056–1065. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06006.x
32. Ibrahim M., Nicolas P., Bessières P., Bolotin A., Monnet V., Gardan R. A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology*, 2007, vol. 153, pt. 11, pp. 3631–3644. doi: 10.1099/mic.0.2007/006205-0
33. Ikebe T., Ato M., Matsumura T., Hasegawa H., Sata T., Kobayashi K., Watanabe H. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, no. 4, e1000832. doi: 10.1371/journal.ppat.1000832



34. Kappeler K.V., Anbalagan S., Dmitriev A.V., McDowell E.J., Neely M.N., Chaussee M.S. A naturally occurring Rgg variant in serotype M3 *Streptococcus pyogenes* does not activate speB expression due to altered specificity of DNA binding. *Infect. Immun.*, 2009, vol. 77, no. 12, pp. 5411–5417. doi: 10.1128/IAI.00373-09
35. Loughman J.A., Caparon M.G. A novel adaptation of aldolase regulates virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Embo J.*, 2006, vol. 25, no. 22, pp. 5414–5422. doi: 10.1038/sj.emboj.7601393
36. Loughman J.A., Caparon M.G. Contribution of invariant residues to the function of Rgg family transcription regulators. *J. Bacteriol.*, 2007, vol. 189, no. 2, pp. 650–655. doi: 10.1128/JB.01437-06
37. Loughman J.A., Caparon M. Regulation of SpeB in *Streptococcus pyogenes* by pH and NaCl: a model for in vivo gene expression. *J. Bacteriol.*, 2006, vol. 188, no. 2, pp. 399–408. doi: 10.1128/JB.188.2.399-408.2006
38. Lyon W., Gibson C.M., Caparon M.G. A role for trigger factor and an rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. *EMBO J.*, 1998, vol. 17, no. 21, pp. 6263–6275. doi: 10.1093/emboj/17.21.6263
39. Merritt J., Kreth J., Shi W., Qi F. LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 57, no. 4, pp. 960–969. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04733.x
40. Nakagawa I., Kurokawa K., Yamashita A., Nakata M., Tomiyasu Y., Okahashi N., Kawabata S., Yamazaki K., Shiba T., Yasunaga T., Hayashi H., Hattori M., Hamada S. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res.*, 2003, vol. 13, pp. 1042–1055. doi: 10.1101/gr.1096703
41. Parashar V., Aggarwal C., Federle M.J., Neiditch M.B. Rgg protein structure-function and inhibition by cyclic peptide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 16, pp. 5177–5182. doi: 10.1073/pnas.1500357112
42. Paterson G.K., Blue C.E., Mitchell T.J. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.*, 2006, vol. 55, pt. 4, pp. 355–363.
43. Pérez-Pascual D., Gaudu P., Fleuchot B., Besset C., Rosinski-Chupin I., Guillot A., Monnet V., Gardan R. RovS and its associated signaling peptide form a cell-to-cell communication system required for *Streptococcus agalactiae* pathogenesis. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 1, e02306-14. doi: 10.1128/mBio.02306-14
44. Pulliainen A.T., Hytönen J., Haataja S., Finne J. Deficiency of the Rgg regulator promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance, AhpCF-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 9, pp. 3225–3235. doi: 10.1128/JB.01843-07
45. Qi F., Chen P., Caufield P.W. Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, no. 9, pp. 3880–3887.
46. Rawlinson E.L., Nes I.F., Skaugen M. Identification of the DNA-binding site of the Rgg-like regulator LasX within the lactocin S promoter region. *Microbiology*, 2005, vol. 151, pt. 3, pp. 813–823. doi: 10.1099/mic.0.27364-0
47. Sanders J.W., Leenhouts K., Burghoorn J., Brands J.R., Venema G., Kok J. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 27, no. 2, pp. 299–310. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00676.x
48. Samen U.M., Eikmanns B.J., Reinscheid D.J. The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 10, pp. 5625–5635. doi: 10.1128/IAI.00667-06
49. Smoot J., Barbian K.D., Van Gompel J.J., Smoot L.M., Chaussee M.S., Sylva G.L., Sturdevant D.E., Ricklefs S.M., Porcella S.F., Parkins L.D., Beres S.B., Campbell D.S., Smith T.M., Zhang Q., Kapur V., Daly J.A., Veasy L.G., Musser J.M. Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 7, pp. 4668–4673. doi: 10.1073/pnas.062526099
50. Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J., Donati C., Medini D., Ward N.L., Angiuoli S.V., Crabtree J., Jones A.L., Durkin A.S., Deboy R.T., Davidsen T.M., Mora M., Scarselli M., Margarit y Ros. I., Peterson J.D., Hauser C.R., Sundaram J.P., Nelson W.C., Madupu R., Brinkac L.M., Dodson R.J., Rosovitz M.J., Sullivan S.A., Daugherty S.C., Haft D.H., Selengut J., Gwinn M.L., Zhou L., Zafar N., Khouri H., Radune D., Dimitrov G., Watkins K., O'Connor K.J., Smith S., Utterback T.R., White O., Rubens C.E., Grandi G., Madoff L.C., Kasper D.L., Telford J.L., Wessels M.R., Rappuoli R., Fraser C.M. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 39, pp. 13950–13955. doi: 10.1073/pnas.0506758102
51. Vahling C.M., McIver K.S. Identification of residues responsible for the defective virulence gene regulator Mga produced by a natural mutant of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 17, pp. 5955–5966. doi: 10.1128/JB.187.17.5955-5966.2005
52. Vickerman M.M., Wang M., Baker L.J. An amino acid change near the carboxyl terminus of the *Streptococcus gordonii* regulatory protein Rgg affects its abilities to bind DNA and influence expression of the glucosyltransferase gene gtfG. *Microbiology*, 2003, vol. 149, pt. 2, pp. 399–406. doi: 10.1099/mic.0.25983-0
53. Vickerman M.M., Minick P.E., Mather N.M. Characterization of the *Streptococcus gordonii* chromosomal region immediately downstream of the glucosyltransferase gene. *Microbiology*, 2001, vol. 147, iss. 11, pp. 3061–3070. doi: 10.1099/00221287-147-11-3061
54. Vickerman M.M., Minick P.E. Genetic analysis of the rgg-gtfG junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 4, pp. 1703–1714. doi: 10.1128/IAI.70.4.1703-1714.2002



55. Vickerman M.M., Iobst S., Jesionowski A.M., Gill S.R. Genome-wide transcriptional changes in *Streptococcus gordonii* in response to competence signaling peptide. *J. Bacteriol.*, 2007, vol. 189, no. 21, pp. 7799–7807. doi: 10.1128/JB.01023-07
56. Xu P., Alves J.M., Kitten T., Brown A., Chen Z., Ozaki L.S., Manque P., Ge X., Serrano M.G., Puiu D., Hendricks S., Wang Y., Chaplin M.D., Akan D., Paik S., Peterson D.L., Macrina F.L., Buck G.A. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J. Bacteriol.*, 2007, vol. 189, no. 8, pp. 3166–3175. doi: 10.1128/JB.01808-06
57. Zheng F., Ji H., Cao M., Wang C., Feng Y., Li M., Pan X., Wang J., Qin Y., Hu F., Tang J. Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 3, pp. 1319–1328. doi: 10.1128/IAI.00193-10
58. Zutkis A.A., Anbalagan S., Chaussee M.S., Dmitriev A.V. Inactivation of the Rgg2 transcriptional regulator ablates the virulence of *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 12, e114784. doi: 10.1371/journal.pone.0114784

**Авторы:**

**Дмитриев А.В.**, д.б.н., зам. директора по научной работе, зав. отделом экологической физиологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины; профессор Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), Санкт-Петербург, Россия;  
**Шосси М.С.**, профессор, отдел фундаментальных биомедицинских наук, Стэнфордская школа медицины, Университет Южной Дакоты, г. Вермиллион, США;  
**Калинина О.В.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной кардиологии ФГБУ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова; ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Поступила в редакцию 28.07.2015  
Отправлена на доработку 07.09.2015  
Принята к печати 11.11.2015

**Authors:**

**Dmitriev A.V.**, PhD, MD (Biology), Deputy Director on Science, Head of the Department of Ecological Physiology, Institute of Experimental Medicine; Professor of St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation;  
**Chaussee M.S.**, Professor, Division of Basic Biomedical Sciences, Stanford School of Medicine, University of South Dakota, Vermillion, USA;  
**Kalinina O.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Research Laboratory of Molecular Cardiology, Almazov Northwest Federal Medical Research Center; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Received 28.07.2015  
Revision received 07.09.2015  
Accepted 11.11.2015

# ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТВ10.4 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, О.А. Добровольская, Е.Г. Богомолова,  
Е.Н. Черняева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** На сегодняшний день туберкулез является одним из самых распространенных и опасных заболеваний в мире. Туберкулез сегодня, как и в начале XX в. — основная причина смерти от инфекционных заболеваний, вызванных бактериальными агентами. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, в 2013 г. в мире туберкулезом заболело более 9 млн человек и около 1,5 млн заболевших погибло. Возбудителем туберкулеза является бактерия *Mycobacterium tuberculosis*, реже — родственные ей виды *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium africanum*. В основном в результате заражения бактериальная инфекция поражает легкие, однако возможно развитие заболевания и в других органах и тканях. На сегодняшний день эффективная вакцинация признана наиболее перспективной стратегией борьбы с туберкулезом. Однако на данный момент единственной зарегистрированной и разрешенной к применению противотуберкулезной вакциной является вакцина БЦЖ. В мире существует много разновидностей этой вакцины; все они производные одного штамма и незначительно различаются между собой по эффективности. Сомнительная эффективность вакцинации БЦЖ и побочные эффекты заставляют научное сообщество разрабатывать новые средства профилактики туберкулеза. Можно выделить ряд направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин, одним из которых является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в организме. На данный момент идентифицирован ряд антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, перспективных для использования в качестве компонентов новых вакцин. Так, культуральный фильтрат *Mycobacterium tuberculosis* содержит иммунодоминантные секретируемые антигены, из которых одним из наиболее изученных является белок ТВ10.4. Белок ТВ10.4 специфичен для микобактерий, распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию IFN $\gamma$ . Белок ТВ10.4 также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий. Учитывая эти свойства, рекомбинантный белок ТВ10.4 может быть использован для создания новых кандидатных вакцин против туберкулеза.

**Ключевые слова:** рекомбинантный ТВ10.4, вакцины, туберкулез, штамм-продуцент, культура клеток, способ очистки.

---

**Адрес для переписки:**

Духовлинов Илья Владимирович  
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,  
ФГУП ГосНИИОЧБ ФМБА России.  
Тел.: 8 (981) 881-82-01 (моб.).  
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

**Contacts:**

Il'ya V. Dukhovlinov  
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7,  
Research Institute of Highly Pure Biopreparations.  
Phone: +7 (981) 881-82-01 (mobile).  
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

**Библиографическое описание:**

Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Добровольская О.А., Богомолова Е.Г., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка ТВ10.4 *Mycobacterium tuberculosis* в клетках *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-315-322

**Citation:**

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. Production of recombinant TB10.4 *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 315–322. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-315-322

## PRODUCTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* TB10.4 RECOMBINANT PROTEIN IN *ESCHERICHIA COLI*

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S.

Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Nowadays tuberculosis is considered one of the most dangerous infectious diseases occurring everywhere, and it remains a cause of death of millions of people around the world. According to the World Health Organization data, in 2013 tuberculosis caused more than 9 million cases worldwide and about 1.5 million of infected people died. The causative agent of tuberculosis in most cases is *Mycobacterium tuberculosis*. But sometimes it can be *Mycobacterium bovis* or *Mycobacterium africanum*. Mainly as a result of infection, a bacterial infection affects the lungs, but the disease may develop in other organs and tissues. Now for the prevention of tuberculosis vaccination of newborns with attenuated vaccine BCG is widely used. The production of this vaccine is cheap and it is safe to use. Thus today, vaccination is the primary means of prevention of tuberculosis. However dubious efficacy and a number of side effects observed after vaccination, makes the scientific community to develop new effective methods for the treatment of tuberculosis. One of the ways to develop new vaccines against tuberculosis is to provide a subunit vaccine based on recombinant proteins. Advantages of subunit vaccines are that the preparation containing the purified protein is stable and secure, its chemical properties are known, it does not contain additional proteins and nucleic acids, which could cause undesirable effects in the human body. One of the most promising antigens for use as components in new vaccines is considered a low molecular weight secreted protein TB10.4. TB10.4 protein is recognized at an early stage of tuberculous infection and contributes to the proliferation of lymphocytes responsible for the production of IFN $\gamma$ . TB10.4 protein also possesses an adjuvant effect when administered in combination with mycobacterial proteins. Given these properties, the recombinant protein TB10.4 can be used to generate new candidate vaccines against tuberculosis. During the study was created high-yield *E. coli* strain, which produces the recombinant protein TB10.4, selected the optimal protocol of induction of the gene encoding the protein. The protein was purified using metal affinity chromatography. The purity of the final preparation reached 98%.

**Key words:** recombinant TB10.4, vaccine, tuberculosis, producing strain, cell culture, purifying method.

## Введение

Основной причиной смерти от инфекционных заболеваний сегодня, как и в начале XX в., является туберкулез [3]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), туберкулезом ежегодно заболевает в мире около 9 млн человек, и около 1,5 млн заболевших умирает. Начиная с 90-х гг. XX в., в России произошло ухудшение эпидемической ситуации. По данным ФГБУ ЦНИИОИЗ МЗ РФ, в 2013 г. в Российской Федерации заболеваемость туберкулезом составила 63 случая на 100 тыс. населения, а смертность — 11,3 случая на 100 тыс. населения.

Возбудителем туберкулеза является патоген *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), реже — родственные ему виды *M. bovis* и *M. africanum*. Основным резервуаром и источником аэрогенной туберкулезной инфекции является бациллярный больной, выделяющий большое количество микобактерий с мокротой или слюной. Кроме того, заражение может происходить алиментарным путем — через употребление молока и молочнокислых продуктов от коров, пораженных *M. bovis*, или яиц от кур, инфицированных *M. avium*. Возможна и кон-

тактная передача инфекции через поврежденные кожные покровы, например, при доении больных животных. В результате аэрогенного заражения туберкулезный процесс чаще возникает в органах дыхания, при алиментарном инфицировании могут поражаться почки, легкие, кости и суставы, периферические лимфоузлы, мочеполовые органы, глаза, центральная нервная система. В зависимости от основных клинических проявлений различают легочную и нелегочные формы туберкулеза. Тем не менее, туберкулез легких остается наиболее распространенной и опасной формой заболевания [3].

Без лечения более половины случаев в течение 5 лет заканчиваются смертью. Если заболевание вызвано чувствительными к противотуберкулезным средствам штаммами микобактерий, правильно назначенное лечение практически всегда дает эффект. Однако в последние годы широкое распространение получили устойчивые к противотуберкулезным средствам штаммы микобактерий, лечение вызванного ими туберкулеза проходит крайне сложно. В связи с этим важным аспектом в борьбе с данным заболеванием является предупреждение развития заболевания — вакцинация [6].

В настоящее время для предупреждения туберкулеза широко используется вакцинирование новорожденных детей живой вакциной БЦЖ. БЦЖ представляет собой живой аттенуированный штамм *M. bovis*, сохранивший свои антигенные и иммуногенные свойства. Относительно невысокая стоимость производства этой вакцины и безопасность ее применения обеспечили широкое распространение вакцинирования как основного средства профилактики туберкулеза. Вакцинация БЦЖ в детском возрасте эффективна в отношении заболевания милиарной формой туберкулеза легких и туберкулезным менингитом. Однако в последние годы усиливаются сомнения относительно ее универсальности и эффективности. Необходимо отметить, что развитие туберкулеза на сегодняшний день выявляется не только у некачественно вакцинированных или невакцинированных детей, но и у лиц, которым вакцина БЦЖ была введена правильно и своевременно [2]. Завершенное 60-летнее изучение результатов вакцинации американских индейцев показало, что долгосрочная эффективность БЦЖ-вакцинирования составляет 52% [5]. Также следует отметить, что БЦЖ, подобно другим живым вакцинам, способна вызывать отрицательные побочные эффекты. Осложнения при вакцинации БЦЖ наблюдаются, в частности, у детей, инфицированных ВИЧ еще до рождения. Принципиальным недостатком вакцины БЦЖ является постепенное (в течение 3–7 лет) снижение поствакцинального иммунитета. Согласно результатам контролируемых исследований, это приводит к практически полному отсутствию защитного эффекта уже через 10 лет после вакцинации [11]. В то же время использование БЦЖ для ревакцинации, направленной на поддержание противотуберкулезного иммунитета, по данным экспертов ВОЗ, признается неэффективным [15], и это подтверждают результаты рандомизированного исследования, проведенного в Бразилии с участием более 300 тыс. школьников в возрасте от 7 до 14 лет [10].

Таким образом, к настоящему времени назрела необходимость разработки вакцин нового поколения как наиболее эффективных иммунопрофилактических средств борьбы с туберкулезом, в первую очередь с его легочной формой.

Одним из направлений разработки новых противотуберкулезных вакцин является создание субъединичных вакцин на основе рекомбинантных белков [3]. Субъединичными называют вакцины, которые содержат только отдельные компоненты патогенного микроорганизма,

эпитопы антигенов, активно распознаваемые иммунной системой. Достоинства субъединичных вакцин заключаются в том, что препарат, содержащий очищенный иммуногенный белок, стабилен и безопасен, его физико-химические свойства известны, в нем отсутствуют дополнительные белки и нуклеиновые кислоты, которые могли бы вызвать нежелательные эффекты в вакцинируемом организме [8].

К началу 2000 г. было получено несколько вариантов субъединичных вакцин, однако их протективный эффект при испытаниях оказался в ряде случаев непредсказуемым и сильно варьировал [13]. Изучение генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv показало, что он содержит 3995 открытых рамок считывания, но лишь для 52% из них удалось предсказать функциональную активность. Анализ протеома позволил выявить не менее 1800 клеточных и 800 секретиремых белков [14].

Удалось идентифицировать ряд антигенов *M. tuberculosis*, перспективных для использования в качестве компонентов новых вакцин. К ним относятся, в частности, иммунодоминантные секретиремые антигены, присутствующие в культуральном фильтрате *M. tuberculosis*, среди которых наиболее изучены антигены семейства ESAT-6 (Early Secret Antigen Target-6). Специфические белки данного семейства обладают высокой иммуногенностью. Среди них наибольшую иммуногенность по уровню антиген индуцированного синтеза  $\gamma$ -интерферона (IFN $\gamma$ ) мононуклеарными клетками периферической крови доноров демонстрирует белок ТВ10.4 с молекулярной массой 10,4 kDa. Он распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию IFN $\gamma$ . Белок ТВ10.4 также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий [1]. Учитывая эти свойства, белок ТВ10.4 является перспективным антигеном для разработки кандидатных вакцин против туберкулеза.

Наиболее эффективной системой для разработки рекомбинантных белковых антигенов является система экспрессии на основе клеток *E. coli*, которая и была выбрана в данном исследовании для получения рекомбинантного белка ТВ10.4 *Mycobacterium tuberculosis*.

## Материалы и методы

*Синтез и клонирование гена, кодирующего белок ТВ10.4.* Синтез последовательности гена *tb10.4 M. tuberculosis* длиной 351 п.о. осуществляли методом ПЦР с использованием



перекрывающихся олигонуклеотидов [9], полученных с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия). Последовательность гена соответствовала аналогичному гену *tb10.4* *M. tuberculosis* штамма H37Rv [4]. В общей сложности для синтеза гена *tb10.4* длиной 351 п.н. было использовано 13 праймеров. Синтезированную последовательность выделяли из агарозного геля после проведения электрофореза и клонировали в плазмидном векторе pGEM-T Easy. После секвенирования ген *tb10.4*, не содержащий замен, переклонировали в векторе pET28a(+) по сайтам рестрикции XhoI и NdeI. Данная плаزمид содержит в своем составе фрагмент, кодирующий полигистидин, находящийся в рамке трансляции на N-конце последовательности. Таким образом, любая клонированная в вектор нуклеотидная последовательность экспрессируется в виде белка, слитого с полигистидином для удобства его дальнейшей очистки с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии. Клонированный в плазмиде pET28a(+) ген *tb10.4* также секвенировали.

*Создание штамма-продуцента белка TB10.4.* Для экспрессии гена, кодирующего белок TB10.4, использовали клетки *E. coli* штамма BL21 Star (DE3) (Invitrogen, США) с генотипом F-ompThsdSB (rB-mB-)galdcn rne131 (DE3), содержащие в геноме  $\lambda$ De3 лизоген и мутацию *rne131*. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. Получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах позволяют *lon*- и *ompT*-мутации по генам протеаз. Трансформацию компетентных клеток плазмидой pET28a(+)*tb10.4* осуществляли методом электропорации.

Для быстрого скрининга рекомбинантных клонов *E. coli* на наличие плазмид pET28a(+)*tb10.4*, плазмидную ДНК выделяли из 2 мл культуры и анализировали электрофорезом в агарозном геле.

Для проверки наличия вставки в плаزمиде проводили реакцию ПЦР. Реакцию проводили в объеме 50 мкл. В качестве матрицы брали материал одной отдельной колонии размером около 1 мм. Реакцию проводили с помощью Taq-полимеразы с использованием праймеров T7 promoter primer, T7 terminator primer в термоциклере C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в течение 35 циклов: 20 с при 95°C, 20 с при 50°C, 60 с при 72°C. Для достраивания образовавшихся цепей ДНК проводили допол-

нительный цикл: 5 мин при 72°C. Результат ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле.

*Индукция экспрессии гена tb10.4.* Осуществляли подбор оптимального прокола индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок TB10.4. Для этого проводили индукцию экспрессии гена с помощью изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в трех концентрациях и при различных температурах.

Индукцию экспрессии гена ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей канамицин в концентрации 25 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0,6–0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии целевого гена добавлением ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,1; 0,5 или 1 мМ. Затем инкубировали при определенной температуре в термостатированном шейкере роторного типа при 200 об./мин в течение ночи. Для подбора оптимального протокола индукции инкубировали культуру при +37°C, +25°C и при +16°C. После чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Далее отбирали аликвоту клеток для анализа. Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза лизата клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) [12]. Осаждали лизат и анализировали растворимость белка: наносили супернатант и осадок на 16%-ный ПААГ и проводили электрофорез в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез).

*Определение локализации целевого белка TB10.4.* Клетки штамма-продуцента после индукции отмывали от питательной среды натрий-фосфатным буфером. Далее определяли локализацию целевого белка по следующей схеме. Клетки подвергали трем циклам соникации на льду по 30 с с перерывом в 2 мин. После этого клетки концентрировали центрифугированием при 10 000g в течение 20 мин. Далее отбирали аликвоты супернатанта и осадка

телец включения для анализа. Контроль осуществляли с помощью диск-электрофореза супернатанта и телец включения после солиubilизации. Электрофорез проводили в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) [12].

**Очистка рекомбинантного белка ТВ10.4.** Очистку рекомбинантного белка ТВ10.4 проводили с использованием метода иммобилизованной металлоаффинной хроматографии с использованием сорбента Ni-НТУ сефарозы [7]. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка. Клетки штамма-продуцента после индукции отмывали от питательной среды натрий-фосфатным буфером и лизировали с помощью 3 циклов соникации на льду по 30 с перерывом в 2 мин. После чего клетки концентрировали центрифугированием при 10 000g в течение 20 мин. Затем проводили солиubilизацию телец включения ресуспендированием осадка клеток в буфере, содержащем 500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 10 мМ имидазол.

Колонку, содержащую Ni-НТУ сефарозу, предварительно уравнивали буфером для нанесения (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 10 мМ имидазол). Солиubilизованные тельца включения наносили на колонку. Далее промывали колонку двумя объемами буфера для нанесения. После этого промывали колонку тремя объемами буфера для промывки (500 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 30 мМ имидазол). Элюировали белок с помощью 4 мл буфера для элюции (500 мМ натрий-фосфатный буфер; рН 8,0; 8 М мочевины; 500 мМ хлористый натрий; 200 мМ имидазол). Собирали фракции по 1 мл, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорда. Далее материал анализировали с помощью диск-электрофореза в 16%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе [12].

**Оценка чистоты полученного препарата белка после иммобилизованной металлоаффинной хроматографии.** Электрофореграмма препарата белка ТВ10.4 была проанализирована с помощью программы ImageJ. Программа предназначена для денситометрического анализа данных различных экспериментов. В ручном режиме были размечены дорожки, затем отмечены полосы, соответствующие белкам в рам-

ках каждой из дорожек. Программа оценивает плотность каждой из полос за вычетом фона, что позволяет рассчитать чистоту целевого белка.

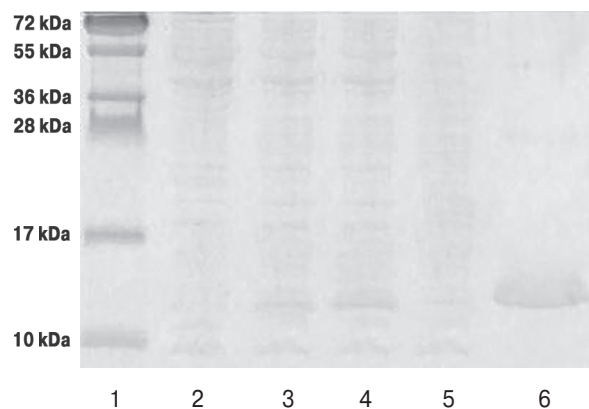
## Результаты

Создан высокопродуктивный штамм-продуцент рекомбинантного белка ТВ10.4 *M. tuberculosis* на основе клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных вектором рЕТ28a(+)*tb10.4*.

Рассчитанная молекулярная масса белка ТВ10.4 составила 12,5 kDa, рI 6.02. Молекулярная масса полученного белка совпала с расчетной.

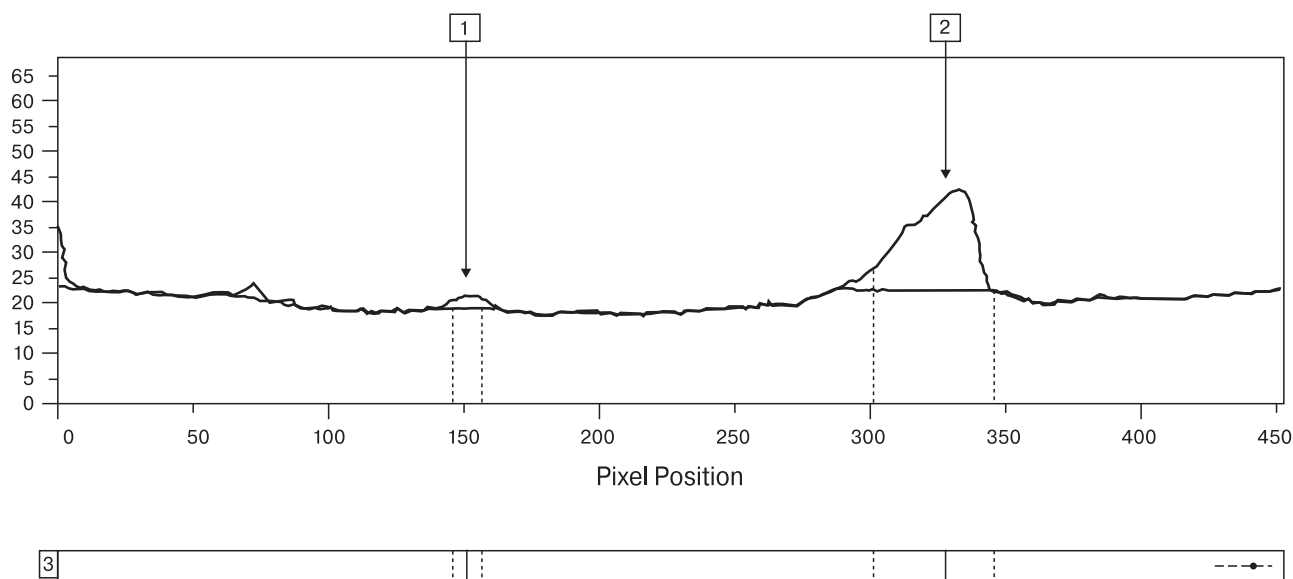
Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена *tb10.4*. Экспрессия гена индуцируется при использовании индуктора ИПТГ во всех трех исследуемых концентрациях (0,1; 0,5 или 1 мМ).

При этом важной особенностью является то, что индукция наблюдается только при инкубации культуры клеток с индуктором в течении ночи при +16°C, а при температурах +37°C и +25°C индукции экспрессии гена не происходит.



**Рисунок 1. Электрофореграмма результатов индукции экспрессии гена *tb10.4* с использованием 0,1 мМ ИПТГ; результатов определения локализации белка ТВ10.4; результатов очистки белка ТВ10.4**

- 16% ПААГ; 0,1% ДДС-Na
1. Маркер молекулярного веса (Fermentas).
  2. Лизат клеток штамма-продуцента до индукции.
  3. Лизат клеток штамма-продуцента после индукции с использованием 0,1 мМ ИПТГ.
  4. Тельца включения.
  5. Супернатант.
  6. Высокоочищенный препарат рекомбинантного белка ТВ10.4, полученный после проведения металлоаффинной хроматографии.



**Рисунок 2.** Денситограмма результатов анализа электрофореграммы высокоочищенного препарата рекомбинантного белка ТВ10.4 в программе ImageJ

При изучении динамики биосинтеза рекомбинантного белка ТВ10.4 в клетках штамма-продуцента выявили максимальный уровень экспрессии гена *tb10.4* после индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ при температуре +16°C, который составил 15% от общего количества клеточного белка. При анализе локализации белка ТВ10.4 было показано, что белок находится в тельцах включения (рис. 1). Это обусловило выбор способа очистки белка в денатурирующих условиях.

Получен высокоочищенный рекомбинантный белок ТВ10.4 с использованием металлоаффинной хроматографии с сорбентом Ni-НТУ сефарозой. По результатам денситометрического анализа электрофореграммы с помощью программы ImageJ рассчитали, что чистота целевого белка составляет 95,9% (рис. 2).

Использование созданного штамма и выбранного протокола индукции позволяет получить до 50 мг высокоочищенного белка ТВ10.4 из 1 л питательной среды.

## Обсуждение

В настоящее время основным средством профилактики туберкулеза является вакцинирование детей аттенуированной вакциной БЦЖ. Показано, что вакцина БЦЖ имеет ряд недостатков, которые дают основание сомневаться в ее универсальности и эффективности. В то же время эффективная вакцинация, направленная на предупреждение формирования «открытых» форм туберкулеза, является важнейшим фактором, ограничивающим

распространение инфекции. Таким образом, необходимость разработки и создания принципиально новых, безопасных иммунопрофилактических и терапевтических средств является приоритетной задачей.

Проблема создания безопасной и простой в производстве и использовании вакцины против туберкулеза, имеющей низкую стоимость, может быть решена за счет использования высокоочищенного рекомбинантного белка или смеси белков. Ввиду этого, использование высокоочищенных рекомбинантных белков, полученных в клетках *E. coli*, в качестве активного вещества вакцины, является наиболее перспективным вариантом. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением в организм живого бактериального штамма, пусть и аттенуированного. Также выбранный белок не несет функций природного белка и, соответственно, не может вызывать побочных эффектов, характерных для вакцин, полученных с использованием живых аттенуированных бактерий.

Показано, что среди антигенов *M. tuberculosis* с протективной активностью центральное место занимают секретируемые белки. Белок ТВ10.4 является секретируемым белком, а также обладает адьювантным действием при введении в комплексе с белками микобактерий, что позволяет рассматривать данный белок в качестве перспективного агента для создания противотуберкулезной вакцины.

Целью исследования являлось получение высокоочищенного рекомбинантного белка

ТВ10.4. Для ее достижения был произведен ряд действий: получен ген, кодирующий рекомбинантный белок ТВ10.4, создан вектор рЕТ28a(+)*tb*10.4, создан высокопродуктивный штамм *E. coli* BL21(DE3)*p*ЕТ28a(+)*tb*10.4 — продуцент рекомбинантного белка ТВ10.4. В работе использовался ген, оптимизированный по кодоновому составу, что увеличило уровень экспрессии. Далее был подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего белок ТВ10.4, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах. Была наработана биомасса, содержа-

щая рекомбинантный белок ТВ10.4, белок был очищен с использованием металлоаффинной хроматографии.

Таким образом, нами был получен высокопродуктивный штамм-продуцент белка ТВ10.4, разработан оптимальный протокол индукции экспрессии целевого гена и способ очистки рекомбинантного белка, который позволяет получать до 50 мг высокоочищенного белка ТВ10.4 из 1 л культуральной среды. Полученный белок может быть использован в качестве компонента кандидатной вакцины против туберкулеза.

## Список литературы/References

1. Поливалентные вакцины, содержащие рекомбинантные вирусные векторы: пат. 012037 США: МПК C12N 7/01, C12N 15/34, C12N 15/31, C12N 15/861, A61K 39/04 / Хавенга М.Я.Э. (Нидерланды), Вогелс Р. (Нидерланды), Седофф Д. (США), Хоун Д. (США), Скейки Я.А.В. (США), Радошевич К. (Нидерланды); заявитель и патентообладатель Круселл Холланд Б.В. (Нидерланды), Эйрас Глоубал Тиби Вэксин Фаундейшн (США); патент. поверенный Медведев В.Н. (Россия). — № 200701084, заявл. 2005.11.15, опубл. 2006.05.26. [*Polivalentnye vaksiny, soderzhashchie rekombinantnye virusnye vektory* [Polyvalent vaccines containing recombinant viral vectors]: *pat.* 012037 США: МПК C12N 7/01, C12N 15/34, C12N 15/31, C12N 15/861, A61K 39/04 / Khavenga M.Ya.E. (Netherlands), Vogels R. (Netherlands), Sedoff D. (USA), Khouon D. (USA), Skeiki Ya.A.V. (USA), Radoshevich K. (Netherlands); applicant and patentee Krusell Kholand B.V. (Netherlands), Eiras Global Tibi Vexin Foundation (USA); patent attorney Medvedev V.N. (Russia). — № 200701084, Appl. 2005.11.15, publ. 2006.05.26. (*In Russ.*)]
2. Стукова М.А., Заболотных Н.В., Виноградова Т.И., Гергерт В.Я., Апт А.С., Капрельянц А.С., Ерохин В.В., Яблонский П.К., Киселев О.И. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 11. С. 45–52. [Stukova M.A., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S., Erokhin V.V., Yablonskii P.K., Kiselev O.I. Prevention of tuberculosis: current approaches to development of vaccines. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 11, pp. 45–52. (*In Russ.*)]
3. Татьков С.И., Дейнеко Е.В., Фурман Д.П. Перспективы создания противотуберкулезных вакцин нового поколения // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15, № 1. С. 114–129. [Tat'kov S.I., Peineko E.V., Furman D.P. Prospects for designing a new generation of anti-tuberculosis vaccine. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2011, vol. 15, no. 1, pp. 114–129. (*In Russ.*)]
4. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Rutter S., Seeger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537–544.
5. Haile M., Källenius G. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 18, no. 3, pp. 211–215.
6. Iem V., Somphavong S., Buisson Y., Steenkeste N., Breyse F., Chomarat M., Sylavanh P., Nanthavong P., Rajoharison A., Berland J.L., Paboriboune P. Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to antibiotics in Lao PDR: first multicentric study conducted in 3 hospitals. *BMC Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, no. 1, 275 p. doi: 10.1186/1471-2334-13-275
7. Invitrogen. Ni-NTA purification system. User manual. Catalog nos. K950-01, K951-01, K952-01, K953-01, K954-01, R901-01, R901-10, R 901-15. Version C. 25-0496, 2006, 32 p.
8. Lindenstrøm T., Agger E.M., Korsholm K.S., Darrah P.A., Aagaard C., Seder R.A., Rosenkrands I., Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 12, pp. 8047–8055. doi: 10.4049/jimmunol.0801592
9. Majumder K. Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene*, 1992, vol. 110, no. 1, pp. 89–94. doi: 10.1016/0378-1119(92)90448-X
10. Rodrigues L.C., Pereira S.M., Cunha S.S., Genser B., Ichihara M.Y., de Brito S.C., Hijjar M.A., Dourado I., Cruz A.A., Sant'Anna C., Bierrenbach A.L., Barreto M.L. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet*, 2005, vol. 366, no. 9493, pp. 1290–1295. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67145-0
11. Russell D.G., Barry C.E., Flynn J.L. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science*, 2010, vol. 328, no. 5980, pp. 852–856. doi: 10.1126/science.1184784
12. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 166, no. 2, pp. 368–379.
13. Sharma A.K., Khuller G.K. Recombinant mycobacterial proteins future directions to improve protective efficacy. *Indian J. Exp. Biol.*, 2001, vol. 39, no. 12, pp. 1214–1219.



14. Skjot R.L.V., Oettinger T., Rosenkrands I., Ravn P., Brock I., Jacobsen S., Andersen P. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, no. 1, pp. 214–220. doi: 10.1128/IAI.68.1.214-220.2000
15. WHO. BCG vaccine. *WHO Wkly Epidemiol. Rec.*, 2004, vol. 79, no. 4, pp. 27–38.

**Авторы:**

**Духовлинов И.В.**, к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Федорова Е.А.**, научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Добровольская О.А.**, младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Богомолова Е.Г.**, младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Черняева Е.Н.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Аль-Шехадат Р.И.**, к.б.н., зам. начальника лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Симбирцев А.С.**, д.м.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Dukhovlinov I.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Fedorova E.A.**, Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Dobrovolskaya O.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Bogomolova E.G.**, Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Chernyaeva E.N.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Al-Shekhadat R.I.**, PhD (Biology), The Deputy Head, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

**Simbirtsev A.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.05.2015  
Отправлена на доработку 15.06.2015  
Принята к печати 17.08.2015

Received 25.05.2015  
Revision received 15.06.2015  
Accepted 17.08.2015

# ИНВАРИАНТНЫЕ ПАТТЕРНЫ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ВИРУСОВ ГРИППА

Е.П. Харченко

ФГБУ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Цель исследования состояла в поиске подходов распознавания по молекулярным характеристикам пандемических штаммов вирусов гриппа А и в попытке выяснить, представляют ли угрозу птичьих штаммы в качестве вероятной причины новой пандемии гриппа. С помощью компьютерного анализа во внутренних белках (нуклеопротеин, матриксные белки М1 и М2, белки полимеразного комплекса РВ1, РВ2 и РА, неструктурный белок NS2; из-за вариативности длины неструктурный белок NS1 был исключен из анализа) штаммов вируса гриппа А пандемий 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2), 1977 (H1N1) и 2009 (H1N1) гг. осуществляли поиск в их первичных структурах инвариантных паттернов. Выявлено, что внутренние белки обучающей выборки пандемических штаммов характеризуются постоянством числа и позиций определенных аминокислот и наличием блоков протяженных инвариантных последовательностей. На основе этих выявленных паттернов инвариантности внутренних белков возможно было безошибочно идентифицировать пандемические штаммы в контрольной выборке. Пандемические штаммы, разделенные по их возникновению десятками лет и отличающиеся составом подтипов гемагглютинина и нейраминидазы (H1, H2, H3 и N1, N2), имеют сильное сходство по внутренним белкам, образуя особое подмножество, от которого в разной степени «отдалены» непандемические штаммы. Это позволяет предположить, что в природе возникновение пандемических штаммов вируса гриппа А связано с конвергенцией их внутренних белков к обнаруженным нами инвариантам пандемичности. Поскольку для выявления инвариантов пандемичности достаточно было обучающей выборки, состоящей из штаммов пандемий 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2), 1977 (H1N1) гг., то пандемию гриппа 2009–2010 гг. можно было бы предсказать на самой ранней ее стадии по данным секвенирования генома и протеома циркулировавших штаммов. По данным сравнительного анализа, внутренние белки птичьих штаммов H5N1 и H7N9 не близки к таковым пандемических штаммов, а для их нуклеопротеина свойственны особенности аминокислотного состава. Это дает основание полагать, что угроза возникновения новой пандемии гриппа, спровоцированной ныне циркулирующими птичьими штаммами, маловероятна. Инвариантные паттерны пандемических штаммов потенциально могут быть использованы для отслеживания предпандемических штаммов среди циркулирующих вирусов гриппа А и выявления траектории формирования возможной пандемической опасности.

**Ключевые слова:** вирус гриппа А, внутренние белки, инвариантные паттерны, пандемический потенциал, распознавание образов, прогнозирование пандемий.

---

**Адрес для переписки:**

Харченко Евгений Петрович  
194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44,  
ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.  
Тел./факс: 8 (812) 552-70-31 (служеб.); 8 904 338-22-80 (моб.).  
E-mail: neuro.children@mail.ru

**Contacts:**

Eugene P. Kharchenko  
194223, Russian Federation, St. Petersburg, Toreza prospect, 44,  
Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences.  
Phone/fax: +7 (812) 552-70-31 (office); 8 904 338-22-80 (mobile).  
E-mail: neuro.children@mail.ru

---

**Библиографическое описание:**

Харченко Е.П. Инвариантные паттерны внутренних белков пандемических вирусов гриппа // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 323–330. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-323-330

**Citation:**

Kharchenko E.P. The invariant patterns of the internal proteins of pandemic influenza viruses // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 323–330. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-323-330

**THE INVARIANT PATTERNS OF THE INTERNAL PROTEINS OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUSES****Kharchenko E.P.***Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** The purpose of the study was to find molecular recognition characteristics of pandemic strains of influenza A viruses and to find out whether avian strains are the probable cause of a new influenza pandemic. Computer analysis of the internal proteins (nucleoprotein, matrix protein M1 and M2 proteins polymerase complex PB1, PB2 and PA, non-structural protein NS2; because of the variability of the length the non-structural NS1 protein was excluded from the analysis) of influenza A virus pandemics in 1918 (H1N1), 1957 (H2N2), 1968 (H3N2), 1977 (H1N1) and 2009 (H1N1) strains was used for search of the invariant pattern primary structure. It was revealed that internal proteins of pandemic strains are characterized by the constancy of the number and positions of certain amino acids and the presence of extended invariant fragments. On the basis of these identified patterns of invariances in internal proteins it was possible to accurately identify pandemic strains in the control sample. Pandemic strains, divided by decades in their emergence and different composition of subtypes of hemagglutinin and neuraminidase (H1, H2, H3 and N1, N2), have strong relationship for their internal proteins, forming a special subset. This suggests that emergence of influenza A virus pandemic strains is related to convergence of their internal proteins to the detected pandemic invariants. To identify pandemic invariant patterns is enough to have the training set including strains of four pandemics (1918, 1957, 1968, 1977). Therefore the 2009–2010 pandemic influenza strain could be predicted at the earliest stage according to its genome and proteome sequencing. According to a comparative analysis, the internal proteins of avian strains H5N1 and H7N9, particularly their nucleoproteins, are not close to those of pandemic strains. This suggests that the threat of a new influenza pandemic, provoked by current circulating avian strains, is unlikely. Invariant patterns of pandemic strains can potentially be used to track pre-pandemic strains among circulating influenza A viruses and detect the formation of a possible trajectory of pandemic alert.

**Key words:** *influenza virus A, internal proteins, invariant patterns, pandemic potential, image recognition, pandemic prognosis.*

Эволюционная изменчивость вирусов гриппа типа А (ВГА) находит явное проявление в многообразии их поверхностных белков: геммагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). На сегодняшний день идентифицировано 17 подтипов НА и 10 подтипов НА [9]. Сопоставление структур НА позволило сгруппировать ВГА в 4 клада [11]. При всем многообразии существующих в природе комбинаций НА и НА, виновниками пандемий 1918, 1957, 1968, 1977 и 2009 гг. служили лишь подтипы H1N1, H2N2 и H3N2. Филогенетический анализ генома и протеома пандемических штаммов (ПШ) дает основание полагать, что пандемические штаммы 1957, 1968, 1977 и 2009 гг. ведут свое происхождение от ПШ птичьего происхождения 1918 г. [7, 13].

В отличие от НА и НА, первичная структура внутренних белков (ВБ) (мембранных белков (M1 и M2), нуклеопротеина (NP), белков полимеразного комплекса (PB1, PB2 и PA) и неструктурных белков (NS1 и NS2) консервативна. С возрождением ПШ 1918 г. [12, 14] уже доступны молекулярные характеристики ПШ пяти последних пандемий гриппа, что позволяет, отвлекаясь от филогенетического контекста, сформулировать вопрос: имеют ли ПШ такие особенности характеристик их ВБ, кото-

рые отличают их от непандемических штаммов (неПШ) (например, сезонных штаммов); то есть возможно ли сегодня безошибочно распознать ПШ среди других штаммов и проследивать возникновение пандемического потенциала у циркулирующих штаммов?

Исследование последних лет показали новые структурно-функциональные связи генома ВГА с организмом хозяина в инфекционном процессе. К примеру, выявлено, что геном вируса является источником регуляторных малых интерферирующих РНК (миРНК), открыты новые рамки считывания генома и др. [1]. Однако не исключено, что возникновение пандемического потенциала у ВГА связано (помимо возникновения новой комбинации НА и НА) и с приобретением ВБ уникальных типовых пандемических паттернов. Для проверки этого предположения нами с помощью компьютерного анализа сопоставлены первичные структуры белков ПШ и неПШ ВГА. Выявлено, что белкам M1, M2, NP, PB1, PB2, PA и NS2 известных ПШ свойственно наличие инвариантных паттернов — общих, строго консервативных блоков в их первичных структурах, отличающих их от неПШ, которые могли бы быть использованы в качестве молекулярных маркеров пандемичности ВГА.

## Материалы и методы

Анализ включал 75 штаммов ВГА, выделенных у человека, свиньи и птиц, в числе которых подтипы H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N9, H9N2, H10N3, H7N7, H4N6 и H6N1. Источником первичных структур их ВБ служили общедоступные в Интернете базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://platform.gisaid.org>). Из-за вариативности длины NS1 белок был исключен из анализа. С помощью первого блока компьютерной программы первичные структуры ВБ были транслированы в их аминокислотные составы. Сравнение последних позволило выявить в первичной структуре M1, M2, NP, PB1, PB2, PA, и NS2 белков пяти ПШ обучающей выборки (H1N1 A/Brevig Mission/1/18, H1N1 A/USSR/90/1977, H1N1 A/California/08/2009, H2N2 A/Japan/305/1957 и H3N2 A/Aichi/2/1968) постоянство числа и позиций для определенных аминокислот. Совокупность этих инвариантов по указанным белкам ПШ обозначена нами как инвариантные паттерны по аминокислотному составу (ИПАС) (см. табл. 1).

С помощью второго блока компьютерной программы на основе этих ИПАС был выполнен поиск в контрольной выборке других ПШ и анализ, по каким белкам и каким аминокислотам в них конкретный неПШ отличался от ПШ. Штамм исключался из числа ПШ, если выявлялось хотя бы одно отличие по ИПАС. Далее путем сравнения аминокислотных последовательностей ВБ пяти ПШ обучающей выборки для каждого белка выводили матрицу инвариантности первичной структуры (МИПС) ПШ (см. пример по белку M2 в табл. 3).

С помощью третьего блока компьютерной программы также был выполнен поиск в контрольной выборке других ПШ и определены отличия белков неПШ от МИПС. Исключение штамма из числа ПШ проводилось при наличии хотя бы одного отличия структуры их ВБ от МИПС.

## Результаты

Первый подход распознавания ПШ был основан на анализе показателей количественного состава аминокислот ВБ у ПШ обучающей выборки, и он позволил выявить два типа ИПАС. Один из них охватывает те аминокислоты, общая численность которых и их позиция в первичной структуре соответствующих белков остается постоянной у всех ПШ. Например,

**ТАБЛИЦА 1. ИНВАРИАНТНЫЕ ПАТТЕРНЫ ПО АМИНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ**

Белок	Инвариантные паттерны аминокислотного состава	
	Первый тип	Второй тип
M1	E(17), <u>W</u> (1), F(7), G(16), M(14)	<u>P</u> (8), <u>C</u> (3), <u>Y</u> (5)
M2	D(6), P(4), C(3), <u>W</u> (2), M(2)	V(6), I(8)
NP	<u>C</u> (6), <u>W</u> (6), F(17), Q(21)	
PB1	H(10), P(32), C(10), Y(25), <u>W</u> (9), F(33)	Q(31)
PB2	<u>W</u> (10), F(24)	E(52), <u>C</u> (5), G(48)
PA	<u>W</u> (12)	E(77)
NS2	H(2), D(5), C(0), <u>W</u> (2)	

**Примечание:** подчеркнутые аминокислоты инвариантны у всех штаммов ВГА.

в белке M2 всех ПШ обучающей выборки число остатков D\* составляет 6 (см. табл. 1), и их позиции в первичной структуре у всех ПШ идентичны (табл. 3). Второй тип ИПАС относится к тем аминокислотам, число которых в соответствующем белке всех ПШ также является постоянным, но не все они характеризуется инвариантной локализацией в первичной структуре белка. Например, в том же белке M2 у всех ПШ число остатков V равно 6 (табл. 1), но позиция одного из остатков V в С-концевой части M2 у штамма (H1N1)A/CALIFORNIA/08/2009 (табл. 3) не совпадает с другими ПШ.

Как видно из представленной в таблице 1 сводки ИПАС обоих типов, каждый ВБ обладает собственным ИПАС: уникальным составом входящих в него аминокислот, их постоянной общей численностью в белке и, соответственно, строго определенными позициями в его первичной структуре для аминокислот, составляющих ИПАС первого типа. В ИПАС входят также инвариантные по числу и расположению аминокислоты, характерные для всех изолятов ВГА, и среди них, в частности, триптофан. Белок PB1 имеет самый сложный, а белок PA — самый простой ИПАС. В целом сводка ИПАС первого типа охватывает 191 позицию аминокислот ВБ у ПШ. Совокупность ИПАС у ВБ позволила правильно распознать все (13 штаммов) ПШ контрольной выборки, исключив остальные 57 неПШ, причем прогноз был правильным как при использовании только ИПАС первого типа, так и при совместном использовании обоих типов ИПАС. Но во втором случае различия

\* В статье используется международный код аминокислот: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, E — глутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин.



**ТАБЛИЦА 2. ОТКЛОНЕНИЯ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А ОТ ИНВАРИАНТНЫХ ПАТТЕРНОВ ПО АМИНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ**

H1N1 A/PUERTO RICO/8/1934	(D = 4) [NP:F(+1); M2:D(-1); PB2:F(+1); NS2:H(+1)]
H1N1 A/DISTRICT OF COLUMBIA/WRAMC-1154048/2008	(D = 5) [M2:D(+1),C(-1); PB1:Y(+1); NS2:H(+2)]
H1N1 A/Mexico/4115/2009	(D = 0)
H5N1 A/Indonesia/5/	(D = 3) [NP:F(+1),Q(+1); PB2:F(-1)]
H7N9 A/Shanghai/2/2013	(D = 7) [NP:F(+1),Q(+1+); M1:F(1), G(+1); M2:D(-2), M(+1)]

**Примечание:** D — общее число («инвариантных») аминокислот, по которым ВБ вируса отличаются от ИПАС ПШ. В квадратных скобках указаны белки и какие в них («инвариантные») аминокислоты в избытке (+) или в недостатке (-) по сравнению с ИПАС ПШ.

неПШ от ПШ были более высокими. При этом достаточно было воспользоваться инвариантными паттернами лишь M1, M2, NP, PB1, PB2 и PA белков, не привлекая данные по NS2 белку. В таблице 2 для примера представлены данные по части штаммов контрольной выборки. Из нее видно, что неПШ отличаются от ПШ по разным сочетаниям белков, причем эти отклонения проявляются как в избыточном, так и в недостаточном количестве инвариантных (для ПШ) аминокислот. Примечательно, что подтипы H5N1 и H7N9 содержат в избытке аминокислоты Q и F в белке NP, что является одной из характерных особенностей NP птичьих штаммов.

Второй подход распознавания «молекулярных образов» ПШ был основан на построении МИПС белков ПШ обучающей выборки. Пример построения МИПС показан на M2 белке в таблице 3. В ней верхние 5 строк представлены первичными структурами белка M2 пяти ПШ обучающей выборки. Из них выводится МИПС M2 (строка 6), в которой обозначены только строго консервативные позиции аминокислот, а точками представлены позиции заменяемых у разных ПШ аминокислот.

Последние, как правило, являются изофункциональными по размеру, гидрофобности или заряду. Ниже матрицы инвариантности M2 представлены первичные структуры M2 птичьих штаммов H5N1 A/Indonesia/5/2005 и H7N9 A/Shanghai/2/2013 (соответственно строки 7 и 8), вызывающих тревогу из-за потенциальной опасности трансформации их в пандемические. Сравнение МИПС с первичными структурами ВБ штаммов контрольной выборки проводилось только по консервативным позициям. Как видно из таблицы 3, в случае белка M2 у H5N1 A/Indonesia/5/2005 имеются отличия (они подчеркнуты) по двум, а у H7N9 A/Shanghai/2/2013 по шести позициям.

Распознавание ВГА на основе МИПС позволило также успешно идентифицировать в контрольной выборке все ПШ и выявило, что ПШ являются наиболее близкими по родству их ВБ. В таблице 4 в качестве иллюстрации представлены различия по МИПС семи ВБ для четырех неПШ ВГА. Видно, что от штамма к штамму отличия от МИПС по каждому ВБ заметно варьируют. Если учесть сильные различия между ВБ по длине, то самыми консервативными являются белки полимеразного комплекса.

**ТАБЛИЦА 3. ПРИМЕР ПОСТРОЕНИЯ МАТРИЦЫ ИНВАРИАНТНОСТИ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДЛЯ БЕЛКА M2 ПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ**

- MSLLTEVETPTRNEWGCRNDSDDLVAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRRLKYLKRGPSSTEGVPEMREERYRKEQQSAVDVDDGHFVNIELE
- MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSDDLVAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRFLKHLKRGPSSTEGVPEMREERYRKEQQNAVDADDSHFVNIELE
- MSLLTEVETPTRSEWECRCSDSDDLVAANIIGILHLILWITDRLFFKCIYRRFKYGLKRGPSSTEGVPEMREERYRKEQQSAVDVDDGHFVNIELE
- MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSDDLVAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRFFKHGLKRGPSSTEGVPEMREERYRKEQQSAVDADDSHFVSIIELE
- MSLLTEVETPIRNEWGCRNDSDDLVAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRFFEHLKRGPSSTEGVPEMREERYRKEQQSAVDADDSHFVSIIELE



- MSLLTEVETP.R.EW.CRC.DSDDLVA.AA.IIGILHLILWILW.DRLFFKCIYR...GLKRGPSSTEGVPEMREERY.EQQ.AVD.DD.HFV.IELE
- MSLLTEVETPTRNEWGCRNDSDDLVAASIIGILHLILWILDRLFFKCIYRRLKYLKRGPSKTVPEMREERYRKEQQSAVDVDDGHFVNIELE
- MSLLTEVETPTRTGWECNCSGSEPLVAANIIGILHLILWILDRLFFKCIYRFFKHGLKRGPSSTEGMPESMREERYRKEQQNAVDVDDGHFVNIELE

**Примечание:** 1 — (H1N1)A/Brevig Mission/1/18; 2 — (H1N1)A/USSR/90/1977; 3 — (H1N1)A/CALIFORNIA/08/2009; 4 — (H2N2)A/Japan/305/1957; 5 — (H3N2)A/AICHI/2/1968; 6 — матрица инвариантности белка M2 для ПШ; 7 — (H5N1)A/Indonesia/5/2005; 8 — (H7N9) A/Shanghai/2/2013. В матрице белка M2(6) подчеркнуты аминокислоты, инвариантные для ПШ по количеству и расположению в первичной структуре (см. табл. 1). В строках 7 и 8 подчеркнуты те позиции аминокислот, которые отличаются от матрицы инвариантности M2(6).

**ТАБЛИЦА 4. ОТЛИЧИЯ ПО ЧИСЛУ АМИНОКИСЛОТ ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А ОТ МАТРИЦ ИНВАРИАНТНОСТИ ПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ**

Штаммы	Внутренние белки							
	M1	M2	NP	PB1	PB2	PA	NS2	Σ
H1N1 A/PuertoRico/8/1934	1	4	6	7	8	4	2	32
H1N1 A/District of Columbia/ WRAMC-1154048/2008	3	3	6	7	10	8	5	42
H1N1 A/Mexico/4115/2009	0	0	0	0	0	0	0	0
H5N1 A/Indonesia/5/2005	5	2	5	5	5	8	4	34
H7N9 A/Shanghai/2/2013	2	6	8	6	4	11	3	40

**Примечание:** Σ — сумма указанных по горизонтали значений отклонений всех ВБ штамма от МИПШ.

По суммарному показателю наиболее удален от ПШ штамм H1N1 A/District of Columbia/WRAMC-1154048/2008. Птичий штамм H5N1 A/Indonesia/5/2005 ближе к ПШ, чем штамм H7N9 A/Shanghai/2/2013.

## Обсуждение

Данные выполненного нами анализа свидетельствуют о том, что распознавание «молекулярных образов» ПШ, основанное на учете разных аспектов первичной структуры ВБ ВГА, оказалось успешным, правильно выделив все ПШ и исключив неПШ в контрольной выборке ВГА. Оно реализовалось благодаря существованию в ВБ у ПШ комплекса инвариантностей, полное сочетание которых не свойственно неПШ. Примечательно, что отличия каждого неПШ от ПШ затрагивают все ВБ (табл. 1 и 4), значительно превосходя заложенный в правило дифференцирования ПШ от неПШ минимальный порог: хотя бы одно отличие. Хотя первый подход распознавания, основанный на ИПАС, является, по существу, «усеченным» вариантом второго подхода, однако по эффективности он не уступает последнему. ПШ, разделенные по их возникновению десятками лет и отличающиеся составом подтипов НА и NA (Н1, Н2, Н3 и N1, N2), имеют сильное сходство по M1, M2, NP, PB1, PB2, PA и NS2 белкам, образуя особое подмножество, от которого на разных расстояниях «отдалены» неПШ. Некоторые неПШ могут быть очень близки и даже идентичны МИПС какого-то одного белка ПШ, но не по всем ВБ. ИПАС и МИПС отдельных белков составляют совокупный инвариантный паттерн ВБ ПШ вируса гриппа А.

Возникает несколько вопросов, и первый из них — можно ли было предсказать пандемию 2009–2010 гг. и возможно ли прогнозировать будущие пандемии? На первую часть этого вопроса можно ответить утвердительно. В наших двух подходах распознавания ПШ в качестве обучающей выборки было бы достаточно

иметь, вместо пяти, четыре штамма пандемий 1918, 1957, 1968 и 1977 гг., чтобы точно определить принадлежность того или иного штамма к ПШ при условии, что в природе возникновение ПШ ВГА связано с конвергенцией его ВБ к выявленным нами инвариантам пандемичности. Это условие у вируса пандемии 2009 г. проявилось, и, следовательно, используя описываемые нами подходы распознавания ПШ, пандемию 2009–2010 гг. можно было предсказать на самой ранней ее стадии по данным секвенирования генома и протеома циркулировавших штаммов.

Некоторые авторы считают, что «абсолютным требованием для возникновения пандемии, по-видимому, является смена НА» [13]. Если признать вспышку эпидемии гриппа в 1977 г. ограниченной пандемией (а характеристики вызвавшего ее штамма H1N1 A/USSR/90/1977 точно соответствуют ПШ), то пандемия гриппа 2009 г. была инициирована возбудителем без смены по отношению к пандемии 1977 г. подтипов НА и NA. Считается, что смена подтипа НА позволяет обойти сформировавшийся популяционный иммунитет к ранее циркулировавшим штаммам ВГА. Однако возможен и другой сценарий: смены самого подтипа НА у возбудителя не происходит из-за высокой мимикрии в его структуре фрагментов различных белков человека, что делает вирус плохо распознаваемым иммунной системой и не препятствует инфекционному процессу с более слабым проявлением патогенности/вирулентности. Либо наоборот: из-за резко выраженных изменений в НА, отличающих его от ранее циркулировавших штаммов ВГА и штаммов, вызвавших предшествовавшую пандемию, ПШ оказывается высоковирулентным. Анализ иммуноэпитопов НА и NA у ПШ 1918, 1977 и 2009 гг. свидетельствует о том, что ПШ 2009 г., по сравнению с ПШ 1918 и 1977 гг., существенно меньше чужероден для иммунной системы человека [2] (то есть пандемия 2009 г.

протекала по первому сценарию), объясняя, по крайней мере частично, почему при пандемии 2009 г. не произошло смены подтипа НА и более слабую вирулентность ПШ 2009 г.

В связи с циркуляцией в природе птичьих штаммов, опасных для человека, естественным представляется вопрос: может ли каждый птичий ВГА, способный инфицировать людей, приобрести пандемичность через последовательно генерируемые изменения фрагментов генома, не лимитированные структурными или функциональными эволюционными ограничениями, или же пандемические вирусы являются редкими образованиями, сложная констелляция фрагментов генома которых не может быть легко сформирована, кроме как посредством редких и пока неясных механизмов [9]. Изначально озабоченность исследователей была вызвана вирусом H5N1. Хотя экспериментально показана возможность обретения ими (через серию мутаций [5] либо реассортацию, ассоциированную с мутациями [6]) трансмиссии воздушно-капельным путем среди других животных, опасения по поводу H5N1 стали несколько ослабевать на фоне новой возникшей вспышки гриппа, виновником которой стал другой птичий вирус. Очередной раунд тревожности связан с вирусом H7N9 [4, 10].

В генерации новых штаммов ВГА, природа, как известно, активно использует и реассортацию, и мутации, и, хотя репликационная система ВГА не обладает строгой редактирующей способностью, само многообразие подтипов НА и NA у ВГА, способных распознавать рецепторы человеческих клеток, служат свидетельством слабого эволюционного ограничения на уровне НА и NA и, соответственно, примером того, что одна и та же функция может реализоваться разными структурами. В то же время, существенную консервативность на уровне белков полимеразного комплекса (или же NS2 белка) можно рассматривать как проявление функционального ограничения. Модификации птичьих штаммов H5N1 показали, что обретение ими трансмиссивности среди экспериментальных животных также можно достичь разными путями [5, 6]. Однако лабораторные модели часто не приемлемы в самой природе. Природа формирования пандемичности является более сложной. Выявление у ПШ инвариантных матриц их ВБ свидетельствует, что возникновение пандемичности требует весьма строгого консенсуса первичных структур вирусных ВБ и, в частности, белков полимеразного комплекса, который проявляет, как показано [3], взаимодействие со множеством белков хозяина.

Из-за стохастичности мутационного процесса и связанных с ней хаотичностью и неопределенностью изменений первичных струк-

тур белков, возможности возникновения ПШ прямо из птичьих штаммов через серийные мутации представляются весьма ограниченными. Ведущим механизмом в возникновении ПШ, судя по данным филогенетического анализа, является реассортация компонентов генома вируса гриппа, сопровождаемая непрерывно протекающим мутационным процессом. В природе ВГА репродуцируется с континуумом изменений первичных последовательностей составляющих их белков, и отдельные штаммы разных хозяев могут содержать какой-то из белков, близкий или идентичный соответствующей МИПС. Такие штаммы вирусов не являются редкостью. Так, М1 белок штамма H1N1 A/PuertoRico/8/1934 отличается от соответствующей МИПС по одной позиции (табл. 4). Реассортация приводит к возникновению множества комбинаций генов, и наиболее жизнеспособными, возможно, оказываются вирионы с констелляцией генов, обеспечивающей наибольшую близость с МИПС. Появление у реассортантов 2–3 белков с МИПС соответствующих белков можно было бы рассматривать как возникновение предПШ, способных формировать траектории пандемичности. Поскольку ПШ обладают наиболее высокими характеристиками по репродукции и трансмиссивности, то приближающиеся к ним предПШ будут, вероятно, обладать более высокой выживаемостью и способностью выступать в качестве аттрактора новых реассортаций, обновляя и еще более приближая состав компонентов их генома к ПШ. Этот гипотетический сценарий способствует быстрому и неожиданному возникновению штамма с пандемическими свойствами, как это случилось с пандемией 2009 г.

Если в отношении происхождения возбудителя пандемии 1918 г. данные филогенетического анализа противоречивы, то не вызывает сомнения, что три последние пандемии явились результатом реассортации предсуществовавших адаптированных к человеку или к свинье вирусов с импортированием генов из птичьих вирусов, но не из-за адаптации *de novo* птичьих ВГА к человеку. Ни одна из пяти последних пандемий, как известно, не была ассоциирована по времени с эпизоотией у домашних или перелетных птиц [9]. Хотя для гриппозной инфекции видовые барьеры низки, различия человеческих и птичьих вирусов гриппа по доминированию у них разных субтипов НА и NA, как и особенности первичных структур их ВБ, служат высоким барьером для трансмиссии птичьих вирусов от человека человеку и последующей продуктивной инфекции [9]. Из таблиц 2 и 4 видно, что даже при высокой консервативности ВБ среди ВГА, штаммы H5N1 и H7N9 не близки к ПШ, и по своим характеристикам

не отличаются от сезонных штаммов H1N1. Если решать дилемму с H5N1 и H7N9 — является ли эти птичьих штаммы «отступающим риском или грядущей катастрофой» человечества [8] — то данные по распознаванию образов ВБ ПШ свидетельствуют о большей вероятности первого.

Возвращаясь к вопросу о прогнозировании возникновения будущих пандемий гриппа, хотелось бы подчеркнуть, что выполненный нами анализ позволяет предположить, что ПШ 1918, 1957, 1968, 1977 и 2009 гг. обрели свой пандемический потенциал конвергенцией их ВБ к пандемическим инвариантам; то есть пандемический потенциал ВГА формировался уникальной комбинацией ВБ, которая случайно и приближенно воссоздавалась через различные промежутки времени, исчисляемые десятками лет. Если эта комбинация молекулярных инвариантных паттернов служит фундаментальной основой пандемичности и воспроизводилась ранее в пандемиях минувших столетий, то прогнозирование будущих пандемий гриппа не представляется уже нереальным или недостижимым. Трудность заключается в необходимости регулярного мониторинга множества циркулирующих в природе штаммов ВГА у разных хозяев и обязательного секвенирования их генов для контроля распространения тех штаммов, которые содержат хотя

бы один из белков, приближающийся к ИПАС и МИПС соответствующего белка ПШ. Циркуляция и реассортация ВГА в разных видах животных и возможность адаптации их к разным хозяевам требуют тесной координации служб надзора в здравоохранении и ветеринарии, единого методологического уровня анализа и открытого обмена полученными данными.

## Заключение

С помощью компьютерного анализа установлено, что ВБ пандемических штаммов ВГА характеризуются наличием инвариантных паттернов в их первичных структурах, что позволило посредством двух подходов распознавания образов безошибочно идентифицировать ПШ в контрольной выборке. Инвариантные паттерны ПШ потенциально могут быть использованы для отслеживания предПШ среди циркулирующих ВГА и выявления траектории формирования возможной пандемической опасности.

## Благодарности

Автор выражает признательность О.И. Киселеву, чья книга «Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1V-2009», побудила к написанию данной статьи.

## Список литературы/References

1. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1V-2009. СПб.—М.: Компания «Димитрейд График Групп», 2011. 163 с. [Kiselev O.I. Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1V-2009 [The genome of pandemic influenza virus A/H1N1V-2009]. *St. Petersburg—Moscow: Dimitrade Grafic Group, 2011. 163 p.*]
2. Харченко Е.П. Иммуноэпитопный континуум белков и возможные его проявления // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7, № 16. С. 179–180 [Kharchenko E.P. Immune epitope continuum of the proteins and possible its applications. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal, 2013, vol. 7, no. 16, pp. 179–180. (In Russ.)*]
3. Bortz E., Westera L., Maamary J., Steel J., Albrecht R.A., Manicassamy B., Chase G., Martínez-Sobrido L., Schwemmler M., García-Sastre A. Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. *MBio, 2011, vol. 2, no. 4, doi: 10.1128/mBio.00151-11*
4. Fouchier R.A.M., Kawaoka Y., Cardona C., Compans R.W., García-Sastre A., Govorkova E.A., Guan Y., Herfst S., Osterstein W.A., Peiris J.S., Perez D.R., Richt J.A., Russell C., Schultz-Cherry S.L., Smith D.J., Steel J., Tompkins S.M., Topham D.J., Treanor J.J., Tripp R.A., Webby R.J., Webster R.G. Gain-of-function experiments on H7N9. *Science, 2013, vol. 341, pp. 612–613. doi: 10.1126/science.341.6146.612*
5. Herfst S., Schrauwen E.J.A., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., Sorrell E.M., Bestebroer T.M., Burke D.F., Smith D.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science, 2012, vol. 336, pp. 1534–1541. doi: 10.1126/science.1213362*
6. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 haemagglutinin (HA) confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature, 2012, vol. 486, no. 7403, pp. 420–428. doi: 10.1038/nature10831*
7. Morens D.M. Editorial commentary: pandemic H5N1: receding risk or coming catastrophe? *Clin. Infect. Dis., 2013, vol. 56, no. 9, pp. 1213–1215. doi: 10.1093/cid/cit051*
8. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. H7N9 avian influenza A virus and the perpetual challenge of potential human pandemicity. *MBio, 2013, vol. 4, no. 4. doi: 10.1128/mBio.00445-13*
9. Morens D.M., Taubenberger J.K. Pandemic influenza: certain uncertainties. *Rev. Med. Virol., 2011, vol. 21, pp. 262–284. doi: 10.1002/rmv.689*
10. Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Pandemic influenza viruses — hoping for the road not taken. *N. Engl. J. Med., 2013, vol. 368, no. 25, pp. 2345–2348. doi: 10.1056/NEJMp1307009*



11. Russell R.J., Gamblin S.J., Haire L.F., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., Skehel J.J. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology*, 2004, vol. 325, no. 2, pp. 287–296. doi: 10.1016/j.virol.2004.04.040
12. Taubenberger J.K., Hultin J.V., Morens D.M. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antivir. Ther.*, 2007, vol. 12, no. 4, pp. 581–591.
13. Taubenberger J.K., Baltimore D., Doherty P.C., Markel H., Morens D.M., Webster R.G., Wilson I.A. Reconstruction of the 1918 influenza virus: unexpected rewards from the past. *MBio*, 2012, vol. 3, no. 5. doi: 10.1128/mBio.00201-12
14. Taubenberger J.K., Morens D.M. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep.*, 2010, vol. 125 (suppl. 3), pp. 16–26.

---

**Автор:**

**Харченко Е.П.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия.

Поступила в редакцию 21.09.2015  
Отправлена на доработку 19.10.2015  
Принята к печати 29.10.2015

---

**Author:**

**Kharchenko E.P.**, PhD, MD (Biology), Senior Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation.

Received 21.09.2015  
Revision received 19.10.2015  
Accepted 29.10.2015

# СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА *TREM-1* С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

А.В. Понасенко<sup>1</sup>, А.Г. Кутихин<sup>1</sup>, М.В. Хуторная<sup>1</sup>, А.Е. Южалин<sup>2</sup>, Н.В. Рутковская<sup>1</sup>, А.С. Головкин<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия

<sup>2</sup> Институт радиационной онкологии и биологии им. Грея, Оксфорд, Великобритания

<sup>3</sup> Северо-Западный федеральный медицинский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Инфекционный эндокардит (ИЭ) представляет собой воспаление эндотелия камер и клапанов сердца и обычно имеет бактериальную этиологию. Развитие ИЭ в значительной степени определяется эффективностью ответа иммунной системы на инфекцию. Генетически детерминированный врожденный иммунный ответ является наиболее важным с точки зрения первичного иммунного реагирования на транзиторную бактериемию. Координация реакций врожденного иммунитета происходит за счет рецепторов, различающих однотипные и филогенетически консервативные молекулы микроорганизмов, участвующие в их стереотипных жизненно важных функциях. В то же время, врожденная иммунная система реагирует как непосредственно на молекулярные паттерны микроорганизмов, так и на потенциально опасные изменения в организме, вызванные инфекцией или другими патологическими процессами. Для быстрого ответа врожденная иммунная система использует неклональные наборы распознающих рецепторов. Одним из таких рецепторов, способных модулировать ответ клеток врожденного иммунитета, является триггерный рецептор, экспрессированный на миелоидных клетках-1 (*TREM-1* — Triggering receptor expressed on myeloid cells type 1). Триггерные рецепторы, экспрессируемые на миелоидных клетках (TREM), являются ключевыми эффекторами врожденного иммунитета, играя важную роль в распознавании инфекционных агентов, особенно бактерий. Было сделано предположение, что наследственные межиндивидуальные различия структуры гена *TREM-1* могут влиять на риск возникновения ИЭ. Для подтверждения гипотезы мы проанализировали распределение генотипов и аллелей полиморфизмов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237) у 110 больных ИЭ, принадлежащих к русскому этносу, и у 300 здоровых доноров крови. Группы не имели статистически значимых отличий по полу, возрасту ( $\pm 4$  года), этнической принадлежности и месту проживания (крупный промышленный регион Западной Сибири). После вычисления отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (95%ДИ), статистически значимой связи исследованных полиморфизмов и вероятности возникновения ИЭ не обнаружено. Однако, выявлено, что полиморфизм rs1817537 *TREM-1* связан со сниженным риском развития ИЭ (ОШ = 0,60; 95%ДИ = 0,37–0,99;  $p = 0,046$  по доминантной модели наследования). Тем не менее, это различие теряло статистическую значимость после поправки на множественные сравнения. Для выяснения роли наследственных межиндивидуальных различий структуры генов врожденного иммунитета в развитии ИЭ необходимы дальнейшие масштабные исследования.

**Ключевые слова:** инфекционный эндокардит, генные полиморфизмы, врожденный иммунитет, *TREM-1*, воспалительный ответ, инфекционный иммунитет.

## Адрес для переписки:

Понасенко Анастасия Валериевна  
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, 6, НИИ КПССЗ.  
Тел.: 8 951 591-05-50 (моб.).  
E-mail: avapanass@mail.ru

## Contacts:

Anastasia V. Ponasenko  
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy avenue, 6,  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases.  
Phone: +7 951 591-05-50 (mobile).  
E-mail: virilab@mail.ru

## Библиографическое описание:

Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Южалин А.Е., Рутковская Н.В., Головкин А.С. Связь полиморфизмов гена *TREM-1* с инфекционным эндокардитом // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-331-338

## Citation:

Ponasenko A.V., Kutikhin A.G., Khutornaya M.V., Yuzhalin A.E., Rutkovskaya N.V., Golovkin A.S. Association of *TREM-1* gene polymorphisms with infective endocarditis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 331–338. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-331-338

**ASSOCIATION OF *TREM-1* GENE POLYMORPHISMS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS**Ponasenko A.V.<sup>a</sup>, Kutikhin A.G.<sup>a</sup>, Khutornaya M.V.<sup>a</sup>, Yuzhalin A.E.<sup>b</sup>, Rutkovskaya N.V.<sup>a</sup>, Golovkin A.S.<sup>c</sup><sup>a</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation<sup>b</sup> Oxford Institute for Radiation Oncology, Oxford, UK<sup>c</sup> Federal North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** Infective endocarditis (IE) is a septic inflammation of endocardium, which generally involves the lining of the heart chambers and heart valves. The development of IE depends in many respects on how properly and efficiently the immune system responds to the occurrence of an infection. Innate immunity, which carries out the response to a transient bacteremia, is genetically determined in a large extent. Pattern recognition receptors, which identify pathogen- and danger-associated molecular patterns, are the main effectors of innate immune response; one of these receptors is triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (*TREM-1*). We hypothesized that inherited variation in *TREM-1* gene may affect individual susceptibility to IE. The distribution of genotypes and alleles of rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, and rs2234237 gene polymorphisms was investigated in 110 Caucasian (Russian) subjects with IE and 300 age-, sex-, and ethnicity-matched healthy blood donors. Odds ratios with 95% confidence intervals were calculated. We found that rs1817537 polymorphism was associated with decreased IE risk (OR = 0.60; 95%CI = 0.37–0.99;  $p = 0.046$ , dominant model); however, this was not significant after an adjustment for multiple comparisons. Therefore, we observed no statistically significant association between the investigated polymorphisms within *TREM-1* gene and IE. Further in-depth investigations in this field are necessary to shed the light on the impact of inherited variation within innate immune response genes on the development of IE.

**Key words:** infective endocarditis, gene polymorphisms, innate immunity, *TREM-1*, inflammatory response, infectious immunity.

**Введение**

Инфекционный эндокардит (ИЭ) представляет собой септическое воспаление эндотелия камер и клапанов сердца [10]. Наиболее часто встречается ИЭ бактериальной этиологии. В основном ИЭ вызывается стафилококками, стрептококками и энтерококками [10]. В то же время другие инфекционные агенты (к примеру, грибы) также могут стать причиной этого заболевания [2, 8]. Как правило, клинически ИЭ проявляется лихорадкой с ознобом, повышенной утомляемостью, недомоганием и сердечными шумами. Результатом воспалительного процесса является нарушение подвижности створок клапанов и возникновение гидродинамических нарушений, что требует хирургической коррекции и проведения полостной операции [10]. Хотя частота ИЭ относительно невелика (2–4 случая на 100 тыс. населения в США и 15–60 случаев на 1 млн в среднем в мире ежегодно), лечение этого заболевания представляет определенные сложности. Несмотря на существенный прогресс в ранней диагностике и совершенствование консервативных и хирургических методов лечения в последние десятилетия, прогноз у многих пациентов с ИЭ остается неблагоприятным [14]. Летальность варьирует от 10% (в случаях стрептококкового ИЭ) до 30–40% (в случаях ИЭ, вызываемого золотистым стафилококком [*S. aureus*]) [5, 17], и до 70% в определенных группах риска [14].

Основными звеньями патогенеза ИЭ являются: бактериемия, травма эндокарда и изменение иммунного реагирования [1]. Развитие ИЭ в значительной степени определяется эффек-

тивностью ответа иммунной системы на инфекцию. В настоящее время выявлена важная роль наследственных межиндивидуальных различий структуры генов иммунной системы в предрасположенности ко многим заболеваниям [18]. Одной из наиболее изученных групп таких различий являются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), которые представляют значительный интерес как возможные предиктивные биомаркеры [18]. Функциональными последствиями однонуклеотидных полиморфизмов могут быть изменение структуры и/или экспрессии белков, образование нового кодона инициации трансляции или нового стоп-кодона, или дестабилизация мРНК [18]. Таким образом, можно предположить, что однонуклеотидные полиморфизмы ключевых генов иммунной системы могут влиять на развитие и течение ИЭ.

Триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-1 (*TREM-1*), регулирует опосредованный нейтрофилами и моноцитами воспалительный ответ, запускаемый бактериальной или грибковой инфекцией. В сравнении с Toll-подобными рецепторами, *TREM-1* значительно менее изучен, однако важность его роли в иммунном ответе не подвергается сомнению. Активация *TREM-1* ведет к дегрануляции, респираторному взрыву и фагоцитозу [12]. Кроме того, *TREM-1* контролирует выделение ряда провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) и хемокинов (IL-8, MCP-1). Более того, было продемонстрировано, что *TREM-1* характеризуется интеграцией своих сигнальных путей с некоторыми Toll-подобными рецепторами. К примеру, *TREM-1* усиливает

TLR-индуцированный воспалительный ответ на протяжении инфекции [7], а также действует синергично с липополисахаридом бактериальной стенки, индуцируя экспрессию многих генов (IL-6, TNF $\alpha$ ) [6]. Известно более 200 полиморфизмов *TREM-1* [11], однако почти все они остаются неизученными.

Цель исследования: определить наличие ассоциативных связей между однонуклеотидными полиморфизмами гена *TREM-1* и риском развития инфекционного эндокардита.

## Материал и методы

**Участники исследования.** В исследование включено 110 принадлежащих к русскому этносу пациентов с верифицированным диагнозом инфекционного эндокардита. Все пациенты перенесли оперативное вмешательство по протезированию клапанов сердца в Кузбасском кардиологическом центре в период с 2009 по 2013 гг. включительно. Все случаи ИЭ были подтверждены гистологически и по модифицированным критериям Duke (1 большой и 1 малый критерий или 3 малых критерия) [3].

Все пациенты с ИЭ получали антибиотикотерапию в острой фазе заболевания в стационарах по месту жительства. В предоперационном периоде в Кузбасском кардиологическом центре также проводилась антибиотикотерапия и лечение всех сопутствующих заболеваний. Контрольная группа была сформирована из 300 асимптомных здоровых доноров крови, не имеющих в анамнезе сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний, без основных факторов риска развития ишемических событий, а также не имеющих статистически значимых отличий от опытной группы по полу, возрасту ( $\pm 4$  года) и этнической принадлежности. Более 90% субъектов опытной и контрольной групп проживали в г. Кемерово и его окрестностях, мигранты и коренное население исключались из исследования. Протокол исследования был утвержден местным этическим комитетом, все

участники исследования подписывали протокол информированного согласия на участие в исследовании.

**Генотипирование.** Исследовано 8 полиморфизмов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237). Данные об этих полиморфизмах представлены в таблице 1. Пять миллилитров цельной периферической венозной крови забиралась в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Геномная ДНК выделялась из лейкоцитов фенол-хлороформным методом в соответствии со стандартным протоколом. Генотипирование проводилось в 96-луночном формате по технологии TaqMan (аллель-специфичная ПЦР в реальном времени) при помощи амплификатора Applied Biosystems ViiA 7 Real-Time PCR System в соответствии с протоколом производителя. Лабораторный персонал, осуществлявший генотипирование, не знал, к опытной или контрольной группе принадлежат субъекты. Контроль качества генотипирования проводился посредством повторного генотипирования 10% образцов.

**Статистический анализ.** Для описания возраста участников исследования вычислялось среднее арифметическое, стандартное отклонение и 95% доверительный интервал (95%ДИ) для среднего арифметического, для описания качественных данных вычислялись доли. Статистический анализ результатов генотипирования проводился посредством программы SNPStats [15]. Равновесие Харди–Вайнберга (РХВ) определялось при помощи критерия хи-квадрат Пирсона с одной степенью свободы для сравнения наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов. Для оценки риска вычислялись отношение шансов (ОШ) и 95% доверительные интервалы (ДИ) в пяти моделях наследования (кодминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Различия признавались статистически значимыми при вероятности отклонить верную нулевую гипотезу  $P$  менее 0,05. Поправка на множественные сравнения прово-

**ТАБЛИЦА 1. СПИСОК ИССЛЕДОВАННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ**

Полиморфизм	Нуклеотидная замена	Позиция	Аминокислотная замена
rs1817537	C > G	407–599	интрон
rs3804277	A > G	407–1204	интрон
rs6910730	A > G	407–2665	интрон
rs7768162	A > G	–64–1054	интрон
rs2234246	A > G	N/A	нетранслируемая область мРНК
rs4711668	C > T	407–2505	интрон
rs9471535	C > T	–64–1033	интрон
rs2234237	A > T	73	Thr25Ser



дилась при помощи вычисления False Discovery Rate (FDR, <http://users.ox.ac.uk/~npike/fdr>) и критерия перестановок (permutation test, Statxact 9, Cytel Inc., MA, США).

## Результаты

В исследование включены 110 пациентов с ИЭ и 300 здоровых доноров крови. Средний возраст обследованных составил 51,87 (50,55–53,18). Статистически значимых различий в распределении пола и возраста между опытной и контрольной группами выявлено не было (табл. 2).

ИЭ нативного клапана был диагностирован у 72,3% (n = 80) пациентов основной группы, ИЭ протезированного клапана – у 27,7% (n = 30). Не было выявлено ни одного случая ИЭ, связанного с имплантированным водителем ритма. Стоит отметить, что 12,7% (n = 14) пациентов имели ИЭ нативного и протезированного клапанов одновременно. Наиболее часто ИЭ поражал митральный клапан (39,1%, n = 43), аортальный клапан (19,1%, n = 21) или одновременно и митральный, и аортальный клапан (18,2%, n = 20). Трикуспидальный клапан поражен в 17,3% (n = 19) случаев, в то время как и митральный, и трикуспидальный клапаны одновременно поражаются лишь в 4,5% (n = 5) случаев. Таким образом, левосторонний ИЭ был диагностирован у 76,4% (n = 84), правосторонний – у 17,3% (n = 19), двусторонний – у 4,5% (n = 5) пациентов. Важно отметить, что 17,3% (n = 19) больных ИЭ являлись потребителями наркотиков. В качестве этиологических агентов ИЭ выступили: *S. epidermidis* (2,7%, n = 3), *S. equi* (1,8%, n = 2), *S. aureus* (4,5%, n = 5) и *Enterococcus* spp. (0,9%, n = 1). В 90,1% (n = 99) этиологический агент ИЭ выявлен не был. У больных ИЭ также были диагностированы гепатит С (7,2%, n = 8), гепатит В (1,8%, n = 2), хроническая почечная недостаточность (13,5%, n = 15), хроническая обструктивная болезнь легких (2,7%, n = 3), пневмония (8,1%, n = 9), пиелонефрит (11,7%, n = 13), ишемическая болезнь сердца (9,0%, n = 10) и легочная гипертензия (24,3%, n = 27).

Распределение частот генотипов всех полиморфизмов отвечало равновесию Харди–Вайнберга (табл. 3), поэтому все полиморфиз-

мы были включены в статистический анализ. Генотипы C/G и G/G полиморфизма rs1817537 были ассоциированы со сниженной вероятностью возникновения ИЭ (ОШ = 0,60; 95%ДИ = 0,37–0,99; p = 0,046) в соответствии с доминантной моделью наследования, однако это различие теряло статистическую значимость после поправки на множественные сравнения. Другие исследованные нами полиморфизмы *TREM-1* не были статистически значимо ассоциированы с ИЭ. Не было найдено статистически значимых различий при стратификации опытной и контрольной групп по гендерным и возрастным подгруппам, а также при сравнении частот гаплотипов в опытной и контрольной группах.

## Обсуждение

Целью нашей работы являлась проверка гипотезы о возможной роли полиморфизмов *TREM-1* в развитии ИЭ. Основываясь на распределении аллелей и генотипов в опытной и контрольной группах, мы выявили, что полиморфизм rs1817537 *TREM-1* был связан со сниженным риском развития ИЭ (ОШ = 0,60; 95%ДИ = 0,37–0,99; p = 0,046) в соответствии с доминантной моделью наследования, однако это различие теряло статистическую значимость после поправки на множественные сравнения. Другие полиморфизмы *TREM-1* не были ассоциированы с вероятностью возникновения ИЭ.

Насколько нам известно, мы провели второе в мире исследование по связи наследственных межличностных различий с риском развития ИЭ и первое – конкретно в отношении роли полиморфизмов *TREM-1* в развитии ИЭ. Роль полиморфизмов *TREM-1* в определении восприимчивости к различным заболеваниям до настоящего времени активно не исследовалась. Было показано, что полиморфизмы rs9471535 и rs2234237 на 60% повышают риск развития интестинальной формы болезни Бехчета [8]. Полиморфизм rs2234237 был ассоциирован с высоким прогностическим риском развития сепсиса в соответствии с тремя моделями наследования [16] и с риском развития вентилятор-ассоциированной пневмонии у пациентов с термическими ожогами [12], однако были получены и противоположные результаты [4].

**ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДУЕМОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

	Контрольная группа	Опытная группа	Всего
Размер выборки, чел. (%)	300 (73,17%)	110 (26,83%)	410 (100,00%)
Средний возраст, лет	53,09 (51,61–54,57)	48,50 (45,81–51,18)	51,87 (50,55–53,18)
Мужчины, чел. (%)	190 (63,00%)	71 (65,00%)	261 (63,66%)
Женщины, чел. (%)	110 (37,00%)	39 (35,00%)	149 (36,34%)

**ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ *TREM-1* В КОНТРОЛЬНОЙ И ОПЫТНОЙ ГРУППАХ (С ПОПРАВКАМИ НА ПОЛ И ВОЗРАСТ)**

Полиморфизм	Модель наследования	Генотип	Контрольная группа	Опытная группа	ОШ (95% ДИ)	Значение p	PXB
rs2234246	Кодоминантная	C/C	78 (26%)	38 (35,2%)	1,00	0,22	Y
		C/T	158 (52,7%)	50 (46,3%)	0,65 (0,38–1,09)		
		T/T	64 (21,3%)	20 (18,5%)	0,63 (0,33–1,23)		
	Доминантная	C/C	78 (26%)	38 (35,2%)	1,00	0,08	
		C/T-T/T	222 (74%)	70 (64,8%)	0,64 (0,39–1,05)		
	Рецессивная	C/C-C/T	236 (78,7%)	88 (81,5%)	1,00	0,52	
		T/T	64 (21,3%)	20 (18,5%)	0,83 (0,46–1,48)		
	Сверхдоминантная	C/C-T/T	142 (47,3%)	58 (53,7%)	1,00	0,27	
C/T		158 (52,7%)	50 (46,3%)	0,77 (0,49–1,23)			
Лог-аддитивная	–	–	–	0,77 (0,55–1,08)	0,13		
rs4711668	Кодоминантная	C/C	116 (38,9%)	35 (32,7%)	1,00	0,31	Y
		T/C	138 (46,3%)	50 (46,7%)	1,12 (0,66–1,88)		
		T/T	44 (14,8%)	22 (20,6%)	1,67 (0,86–3,24)		
	Доминантная	C/C	116 (38,9%)	35 (32,7%)	1,00	0,37	
		T/C-T/T	182 (61,1%)	72 (67,3%)	1,25 (0,77–2,03)		
	Рецессивная	C/C-T/C	254 (85,2%)	85 (79,4%)	1,00	0,14	
		T/T	44 (14,8%)	22 (20,6%)	1,57 (0,87–2,85)		
	Сверхдоминантная	C/C-T/T	160 (53,7%)	57 (53,3%)	1,00	0,81	
T/C		138 (46,3%)	50 (46,7%)	0,94 (0,59–1,50)			
Лог-аддитивная	–	–	–	1,26 (0,91–1,75)	0,16		
rs3804277	Кодоминантная	C/C	80 (26,7%)	40 (37%)	1,00	0,15	Y
		C/T	158 (52,7%)	48 (44,4%)	0,60 (0,36–1,01)		
		T/T	62 (20,7%)	20 (18,5%)	0,65 (0,33–1,25)		
	Доминантная	C/C	80 (26,7%)	40 (37%)	1,00	0,052	
		C/T-T/T	220 (73,3%)	68 (63%)	0,61 (0,38–1,00)		
	Рецессивная	C/C-C/T	238 (79,3%)	88 (81,5%)	1,00	0,66	
		T/T	62 (20,7%)	20 (18,5%)	0,88 (0,49–1,57)		
	Сверхдоминантная	C/C-T/T	142 (47,3%)	60 (55,6%)	1,00	0,15	
C/T		158 (52,7%)	48 (44,4%)	0,71 (0,45–1,13)			
Лог-аддитивная	–	–	–	0,77 (0,55–1,08)	0,12		
rs2234237	Кодоминантная	T/T	238 (79,3%)	83 (76,8%)	1,00	0,53	Y
		A/T	60 (20%)	25 (23,1%)	1,23 (0,70–2,14)		
		A/A	2 (0,7%)	0 (0%)	–		
	Доминантная	T/T	238 (79,3%)	83 (76,8%)	1,00	0,53	
		A/T-A/A	62 (20,7%)	25 (23,1%)	1,20 (0,69–2,09)		
	Рецессивная	T/T-A/T	298 (99,3%)	108 (100%)	1,00	0,39	
		A/A	2 (0,7%)	0 (0%)	–		
	Сверхдоминантная	T/T-A/A	240 (80%)	83 (76,8%)	1,00	0,46	
A/T		60 (20%)	25 (23,1%)	1,23 (0,71–2,15)			
Лог-аддитивная	–	–	–	1,15 (0,67–1,98)	0,6		

**ОКОНЧАНИЕ ТАБЛИЦЫ 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ *TREM-1* В КОНТРОЛЬНОЙ И ОПЫТНОЙ ГРУППАХ (С ПОПРАВКАМИ НА ПОЛ И ВОЗРАСТ)**

Полиморфизм	Модель наследования	Генотип	Контрольная группа	Опытная группа	ОШ (95% ДИ)	Значение p	РХВ
rs6910730	Кодоминантная	A/A	236 (78,7%)	81 (75%)	1,00	0,33	Y
		A/G	61 (20,3%)	27 (25%)	1,31 (0,76–2,26)		
		G/G	3 (1%)	0 (0%)	–		
	Доминантная	A/A	236 (78,7%)	81 (75%)	1,00	0,4	
		A/G-G/G	64 (21,3%)	27 (25%)	1,26 (0,74–2,17)		
	Рецессивная	A/A-A/G	297 (99%)	108 (100%)	1,00	0,26	
		G/G	3 (1%)	0 (0%)	–		
	Сверхдоминантная	A/A-G/G	239 (79,7%)	81 (75%)	1,00	0,31	
		A/G	61 (20,3%)	27 (25%)	1,33 (0,77–2,28)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,19 (0,71–2,00)	0,51		
rs1817537	Кодоминантная	C/C	79 (26,3%)	40 (37%)	1,00	0,13	Y
		C/G	158 (52,7%)	48 (44,4%)	0,60 (0,35–1,00)		
		G/G	63 (21%)	20 (18,5%)	0,63 (0,33–1,22)		
	Доминантная	C/C	79 (26,3%)	40 (37%)	1,00	0,046	
		C/G-G/G	221 (73,7%)	68 (63%)	0,60 (0,37–0,99)		
	Рецессивная	C/C-C/G	237 (79%)	88 (81,5%)	1,00	0,62	
		G/G	63 (21%)	20 (18,5%)	0,86 (0,48–1,55)		
	Сверхдоминантная	C/C-G/G	142 (47,3%)	60 (55,6%)	1,00	0,15	
		C/G	158 (52,7%)	48 (44,4%)	0,71 (0,45–1,13)		
Лог-аддитивная	–	–	–	0,76 (0,55–1,06)	0,11		
rs9471535	Кодоминантная	T/T	238 (79,3%)	81 (75,7%)	1,00	0,45	Y
		C/T	60 (20%)	26 (24,3%)	1,30 (0,75–2,25)		
		C/C	2 (0,7%)	0 (0%)	–		
	Доминантная	T/T	238 (79,3%)	81 (75,7%)	1,00	0,4	
		C/T-C/C	62 (20,7%)	26 (24,3%)	1,27 (0,73–2,20)		
	Рецессивная	T/T-C/T	298 (99,3%)	107 (100%)	1,00	0,39	
		C/C	2 (0,7%)	0 (0%)	–		
	Сверхдоминантная	T/T-C/C	240 (80%)	81 (75,7%)	1,00	0,35	
		C/T	60 (20%)	26 (24,3%)	1,31 (0,75–2,27)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,22 (0,71–2,08)	0,47		
rs7768162	Кодоминантная	G/G	121 (40,3%)	36 (34%)	1,00	0,25	Y
		A/G	146 (48,7%)	53 (50%)	1,11 (0,67–1,85)		
		A/A	33 (11%)	17 (16%)	1,86 (0,90–3,85)		
	Доминантная	G/G	121 (40,3%)	36 (34%)	1,00	0,38	
		A/G-A/A	179 (59,7%)	70 (66%)	1,24 (0,77–2,01)		
	Рецессивная	G/G-A/G	267 (89%)	89 (84%)	1,00	0,1	
		A/A	33 (11%)	17 (16%)	1,76 (0,90–3,43)		
	Сверхдоминантная	G/G-A/A	154 (51,3%)	53 (50%)	1,00	0,81	
		A/G	146 (48,7%)	53 (50%)	0,95 (0,59–1,51)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,30 (0,92–1,84)	0,14		

В нашем исследовании этиологический агент ИЭ был установлен менее чем в 10% случаев, что отличается от обычных показателей (80–90%). Это может быть объяснено особенностями российской системы здравоохранения. Большинство пациентов поступало для хирургического лечения после, по меньшей мере, одного курса антибиотикотерапии в стационаре по месту жительства или амбулаторно. Низкая летальность может быть обусловлена проведением у большинства больных ИЭ на дооперационном этапе консервативной терапии в местных стационарах до стабилизации состояния, поэтому даже редкие случаи смерти больных ИЭ в нашем исследовании были вызваны не тяжестью заболевания, а хирургическими или реанимационными осложнениями. Высокая летальность при ИЭ обычно встречается в стационарах первичной госпитализации этих больных, в то время как в Кузбасский кардиологический центр пациенты с ИЭ обычно поступают для планового лечения и только в состоянии компенсации или субкомпенсации.

Данное исследование имеет ряд ограничений. Вследствие низкой частоты ИЭ размер выборки был относительно невелик. Тем не менее, нам удалось провести достаточно масштабное исследование по связи наследственных межиндивидуальных различий с ИЭ. Дополнительным ограничением было формирование выборки из числа поступивших в стационар

пациентов. В наше исследование не вошли те пациенты, которые либо умерли на догоспитальном этапе в результате тяжелого течения ИЭ, либо не направлены на хирургическое лечение по тем или иным причинам. Кроме того, мы объединили в одном исследовании пациентов с инфекционным эндокардитом нативных и протезированных (биологические протезы) клапанов сердца, что, с одной стороны, не противоречит высказанной нами гипотезе о роли полиморфизма генов рецепторов врожденного иммунитета в патогенезе данного заболевания, а с другой – требует более пристального внимания при дальнейшем изучении данной проблемы. Считаем, что в настоящее время вопрос роли наследственных межиндивидуальных различий структуры генов врожденного иммунитета в развитии ИЭ остается открытым; для его решения необходимы дальнейшие масштабные исследования

## Выводы

Определено, что не имеется статистического подтверждения связи 8 полиморфизмов *TREM-1* (rs1817537, rs3804277, rs6910730, rs7768162, rs2234246, rs4711668, rs9471535, rs2234237) с вероятностью возникновения инфекционного эндокардита в обследованной когорте этнически русских пациентов, проходящих хирургическое лечение по поводу коррекции приобретенного порока сердца.

## Список литературы/References

1. Тюрин В.П. Инфекционные эндокардиты: руководство. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2012 368 с. [Tyurin V.P. Infektsionnye endokardity: rukovodstvo. [Infectious endocarditis: guidelines] Moscow: GEOTAR-Media, 2012. 368 p.]
2. Baddley J.W., Benjamin D.K. Jr, Patel M., Miró J., Athan E., Barsic B., Bouza E., Clara L., Elliott T., Kanafani Z., Klein J., Lerakis S., Levine D., Spelman D., Rubinstein E., Tornos P., Morris A.J., Pappas P., Fowler V.G. Jr, Chu V.H., Cabell C.; International collaboration on endocarditis-prospective cohort study group (ICE-PCS). Candida infective endocarditis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, vol. 27, no. 7, pp. 519–529. doi: 10.1007/s10096-008-0466-x
3. Baddour L.M., Wilson W.R., Bayer A.S., Fowler V.G. Jr, Bolger A.F., Levison M.E., Ferrieri P., Gerber M.A., Tani L.Y., Gewitz M.H., Tong D.C., Steckelberg J.M., Baltimore R.S., Shulman S.T., Burns J.C., Falace D.A., Newburger J.W., Pallasch T.J., Takahashi M., Taubert K.A. Infective endocarditis. Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications. *Circulation*, 2005, no. 111, pp. 394–434. doi: 10.1161/circulationaha.105.165564
4. Chen Q., Zhou H., Wu S., Wang H., Lv C., Cheng B., Xie G., Fang X. Lack of association between *TREM-1* gene polymorphisms and severe sepsis in a chinese han population. *Hum. Immunol.*, 2008, vol. 69, no. 3, pp. 220–226. doi: 10.1016/j.humimm.2008.01.013
5. Chu V.H., Cabell C.H., Benjamin D.K. Jr, Kuniholm E.F., Fowler V.G. Jr, Engemann J., Sexton D.J., Corey G.R., Wang A. Early predictors of in-hospital death in infective endocarditis. *Circulation*, 2004, vol. 109, no. 14, pp. 1745–1749. doi: 10.1161/01.CIR.0000124719.61827.7F
6. Dower K., Ellis D.K., Saraf K., Jelinsky S.A., Lin L.L. Innate immune responses to *TREM-1* activation: overlap, divergence, and positive and negative cross-talk with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 5, pp. 3520–3534. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3520
7. Ford J.W., McVicar D.W. *TREM* and *TREM*-like receptors in inflammation and disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 1, pp. 38–46. doi: 10.1016/j.coi.2009.01.009
8. Izumi K., Hisata Y., Hazama S. A rare case of infective endocarditis complicated by *Trichosporonasahii* fungemia treated by surgery. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2009, vol. 15, no. 5, pp. 350–353
9. Jung E.S., Kim S.W., Moon C.M., Shin D.J., Son N.H., Kim E.S., Lee H.J., Hong S.P., Kim T.I., Kim W.H., Cheon J.H. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and inflammatory bowel diseases in the korean population. *Life Sci.*, 2011, vol. 89, no. 9–10, pp. 289–294. doi: 10.1016/j.lfs.2011.06.018



10. Karchmer A.W. Infective endocarditis. In: Harrison's principles of internal medicine. Eds. Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J.; 18<sup>th</sup> ed. *New York: McGraw-Hill, 2012.*
11. Molloy E.J. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) family and the application of its antagonists. *Recent Pat. Antiinfect. Drug. Discov., 2009, vol. 4, no. 1, pp. 51–56. doi: 10.2174/157489109787236292*
12. Nathan C., Ding A. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med., 2001, vol. 7, no. 5, pp. 530–532. doi: 10.1038/87846*
13. Rivera-Chávez F.A., Huebinger R.M., Burris A., Liu M.M., Minei J.P., Hunt J.L., Arnoldo B.D., Barber R.C. A TREM 1 polymorphism A/T within the exon 2 is associated with pneumonia in burn-injured patients. *ISRN Inflamm., 2013. doi: 10.1155/2013/431739*
14. San Román J.A., López J., Vilacosta I., Luaces M., Sarriá C., Revilla A., Ronderos R., Stoermann W., Gómez I., Fernández-Avilés F. Prognostic stratification of patients with left-sided endocarditis determined at admission. *Am. J. Med., 2007, vol. 120, no. 4, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.05.071*
15. Solé X., Guinó E., Valls J., Iniesta R., Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics, 2006, vol. 22, no. 15, pp. 1928–1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268*
16. Su L., Liu C., Li C., Jiang Z., Xiao K., Zhang X., Li M., Yan P., Feng D., Xie L. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. *Inflammation, 2012, vol. 35, no. 6, pp. 1833–1843. doi: 10.1007/s10753-012-9504-z*
17. Wang A., Athan E., Pappas P.A., Fowler V.G. Jr, Olaison L., Paré C., Almirante B., Muñoz P., Rizzi M., Naber C., Logar M., Tattevin P., Iarussi D.L., Selton-Suty C., Jones S.B., Casabé J., Morris A., Corey G.R., Cabell C.H. International collaboration on endocarditis-prospective cohort study investigators. Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis. *JAMA, 2007, vol. 297, no. 12, pp. 1354–1361. doi: 10.1001/jama.297.12.1354*
18. Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Manag. Res., 2012, vol. 4, pp. 131–135. doi: 10.2147/CMAR.S30855*

**Авторы:**

**Понасенко А.В.**, к.м.н., зав. лабораторией геномной медицины ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

**Кутихин А. Г.**, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

**Хуторная М.В.**, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

**Рутковская Н.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, г. Кемерово, Россия;

**Южалин А.Е.**, аспирант кафедры онкологии, Институт радиационной онкологии и биологии им. Грея, Оксфорд, Великобритания;

**Головкин А.С.**, д.м.н., старший научный сотрудник Института молекулярной биологии и генетики Северо-Западного Федерального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Ponassenko A.V.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

**Kutikhin A.G.**, Junior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

**Khutornaya M.V.**, Junior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

**Rutkovskaya N.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Bioprosthetic Heart Valves, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation;

**Yuzhalin A.E.**, PhD Candidate, Department of Oncology, CRUK and MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, Oxford, Great Britain;

**Golovkin A.S.**, PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Institute of Molecular Biology and Genetics, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.04.2015  
Отправлена на доработку 29.06.2015  
Принята к печати 13.10.2015

Received 28.04.2015  
Revision received 29.06.2015  
Accepted 13.10.2015

# ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА НЕМАТОFLOW

А.А. Савченко<sup>1</sup>, А.Г. Борисов<sup>1</sup>, Е.Н. Анисимова<sup>2</sup>, В.Д. Беленюк<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>3,4</sup>, И.В. Решетников<sup>5</sup>, С.В. Квятковская<sup>5</sup>, В.Э. Цейликман<sup>5</sup>, А.Н. Зорин<sup>6</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия

<sup>5</sup> ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия

<sup>6</sup> КГБУЗ Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1, г. Красноярск, Россия

**Резюме.** Целью исследования явилась оценка информативности метода Nematoflow при определении патогенетической значимости нарушения состояния клеточных реакций врожденного и адаптивного иммунитета, а также решения вопроса о назначении иммуотропного лечения больным онихомикозами. Обследовано 42 больных с онихомикозами стоп и кистей/стоп в возрасте 20–45 лет до назначения им системной антифунгальной терапии. Диагноз онихомикоза был подтвержден микроскопическим исследованием фрагментов поврежденной ногтевой пластинки. Рост культуры гриба на специальных средах отмечался у 64% обследованных. В качестве контроля обследовано 24 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе и проточном цитометре с использованием набора антител Cytodiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. Оценка фенотипического состава лейкоцитов с помощью метода Nematoflow позволила установить у больных онихомикозами нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета. Обнаружены незначительные изменения в популяционном составе гранулярных лейкоцитов в периферической крови больных, выражающиеся в увеличении содержания юных и сегментоядерных гранулоцитов. На фоне моноцитопении у больных онихомикозами повышается содержание «классических» моноцитов и снижается уровень «неклассических» моноцитов. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов крови выявляются у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет и сохраняются в течение всего заболевания. Наиболее выраженные изменения у больных онихомикозами обнаружены со стороны показателей адаптивного иммунитета. Лимфопения у данных больных реализуется за счет снижения количества незрелых и зрелых В-клеток, но при повышении содержания Т-лимфоцитов. Причем если содержание незрелых В-клеток снижается уже у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет, то изменение количества зрелых Т- и В-лимфоцитов выявляется при продолжительности заболевания 3–10 и более 10 лет. Данные изменения в содержании Т- и В-лимфоцитов отражают иммунопатогенетические процессы и определяют значимость Т- и В-клеточного иммунитета при онихомикозах. В целом, метод Nematoflow является информативным в оценке нарушения состояния клеточного

---

**Адрес для переписки:**

Кудрявцев Игорь Владимирович  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ ИЭМ.  
Тел.: +7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

**Contacts:**

Igor V. Kudryavtsev  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Akademika Pavlova str., 12,  
Scientific Research Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (812) 234-29-29.  
E-mail: igorek1981@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Савченко А.А., Борисов А.Г., Анисимова Е.Н., Беленюк В.Д., Кудрявцев И.В., Решетников И.В., Квятковская С.В., Цейликман В.Э., Зорин А.Н. Исследование фенотипа лейкоцитов крови у больных онихомикозами с помощью метода Nematoflow // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 339–348. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-339-348

**Citation:**

Savchenko A.A., Borisov A.G., Anisimova E.N., Belenyuk V.D., Kudryavtsev I.V., Reshetnikov I.V., Kvjatkovskaja S.V., Cejlikman V.Je., Zorin A.N. Blood leukocytes phenotyping by Nematoflow method in patients with onychomycosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 339–348. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-339-348

врожденного и адаптивного иммунитета. Он позволяет оценивать степень тяжести иммунопатологического процесса, механизм и уровень повреждения иммунной системы, можно рекомендовать его применение для персонализированного подхода к назначению иммуотропного лечения.

**Ключевые слова:** онихомикозы, метод Hematoflow, лейкоциты, субпопуляции моноцитов, Т-лимфоциты, В-лимфоциты.

## BLOOD LEUKOCYTES PHENOTYPING BY HEMATOFLOW METHOD IN PATIENTS WITH ONYCHOMYCOSIS

Savchenko A.A.<sup>a</sup>, Borisov A.G.<sup>a</sup>, Anisimova E.N.<sup>b</sup>, Belenyuk V.D.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>c,d</sup>, Reshetnikov I.V.<sup>e</sup>, Kvjatkovskaja S.V.<sup>e</sup>, Cejlikman V.Je.<sup>e</sup>, Zorin A.N.<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>b</sup> Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>e</sup> South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation

<sup>f</sup> Krasnoyarsk Regional sexually transmitted infection clinic No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the investigation was to evaluate the information content of Hematoflow method in the pathogenetic significance in determining the violations of the cellular responses of innate and adaptive immunity, as well as the decision on the appointment of immunotropic treatment of patients with onychomycosis. The study involved 42 patients with onychomycosis feet and hands/feet at the age of 20–45 years before the appointment of a systemic antifungal therapy. The diagnosis of mycosis, onychomycosis was confirmed by microscopic examination of the fragments of the damaged nail plate. The growth of the fungus culture on special media was observed in 64% of patients. 24 healthy persons were examined as controls. A study of the phenotype of white blood cells was performed on a dual-platform technology hematology analyzer and flow cytometry using a set of antibodies Cytodiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. The phenotypic composition evaluation of the white blood cells by the Hematoflow method allowed to establish in patients with onychomycosis the violation cellular innate and adaptive immunity. Minor changes were detected in the population composition of granule cells in the peripheral blood of patients manifested to an increase in the content of the young and segmented granulocytes. When monotsitopeniya patients with onychomycosis increases the content of the «classic» monocytes and decreases the level of «non-classical» monocytes. Changes in the composition of blood monocytes subpopulation identified in patients with the infection lasting up to 3 years and stored in the course of the disease. The most pronounced changes were found in patients with onychomycosis by the performance of adaptive immunity. Lymphopenia in these patients is realized by reducing the number of immature and mature B-cell, but by increasing the content of T-lymphocytes. Moreover, if the content of immature B-cells have decreased in patients with a duration of infection of up to 3 years, the change in the number of mature T- and B-lymphocytes detected during disease duration 3–10 and 10 years. These changes in the content of T- and B-lymphocytes reflect immunopathogenetic processes and determine the importance of T- and B-cell immunity in onychomycosis. In general, the Hematoflow method is informative in assessing violations the cell of innate and adaptive immunity. It allows to evaluate the severity of the immunopathological process mechanism and the level of damage to the immune system, can recommend its use for a personalized approach to the appointment immunotropic treatment.

**Key words:** onychomycosis, method Hematoflow, leukocytes, subpopulations of monocytes, T-lymphocytes, B-lymphocytes.

Онихомикозы — одно из наиболее частых инфекционных поражений ногтевой пластинки, вызванных чаще всего патогенными или условно-патогенными грибами [7, 10, 17, 27]. По сравнению с другими грибковыми инфекциями кожи, онихомикоз наиболее трудно поддается лечению, часто возникают рецидивы [13, 25, 26]. Особенности развития и течения онихомикозной инфекции определяются не только самим этиологическим фактором, но и нарушением барьерной функции кожи, периферическими ангиопатиями, различными анатомическими дефектами и прочее.

В этиологии и патогенезе онихомикозов значительную роль играют нарушения в иммунной системе. В связи с тем, что онихомикозы

определяются как вялотекущее хроническое инфекционное заболевание, с иммунологических позиций его можно характеризовать как стойкое гипореактивное иммунное нарушение клеточно-эффекторного звена [2, 4, 15, 16, 23]. В связи с этим, в комплексной терапии онихомикозов для успешного лечения необходимо применять иммуотропные препараты [3, 11]. Однако для эффективного проведения иммуоактивной терапии необходимо осуществить высокоточные иммунологические исследования с оценкой как адаптивного, так и врожденного звеньев иммунитета. Таким комплексным анализом обладает метод Hematoflow с использованием комплекта реагентов Cytodiff для проведения цитофлуориметрических исследований [21,

24]. Данный метод основан на количественном определении всех основных популяций клеток иммунной системы — нейтрофильных гранулоцитов различного уровня дифференцировки, эозинофилов, субпопуляций моноцитов и лимфоцитов — в периферической крови, что позволяет оценить состояние врожденного и адаптивного клеточного иммунитета.

Целью данного исследования была оценка информативности метода Hemaflow при определении патогенетической значимости нарушения состояния клеточных реакций врожденного и адаптивного иммунитета, а также решение вопроса о назначении иммуноотропного лечения больным онихомикозами.

## Материалы и методы

На базе КГБУЗ «Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1» обследовано 42 больных с онихомикозами стоп и кистей/стоп в возрасте 20–45 лет до назначения им системной антифунгальной терапии. Диагноз онихомикоза был подтвержден микроскопическим исследованием фрагментов поврежденной ногтевой пластинки в нативном препарате с 10% раствором КОН в 100% случаев. Рост культуры гриба на специальных средах, содержащих углеводы (среда Сабуро, картофельный агар с глюкозой, картофельно-морковный агар, среда ДТМ, среда Чапека–Докса, хромогенные среды), отмечался только у 64% обследованных. Спектр выявленных микромицетов: дерматомицеты — *Trichophyton* spp., *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Microsporum canis*; нитчатые недерматомицеты — *Aspergillus niger*, *Alternaria* spp., *A. alternate*, *Penicillini* spp.; дрожжи — *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Exophiala dermatitidis*, *Geotrichum* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. Сочетанная микотическая инфекция (два возбудителя) была установлена у 6 больных с онихомикозом стоп. Основанием для включения пациентов в обследование была постановка диагноза на основании клинической картины заболевания и данных лабораторного обследования. Критерием исключения из обследования явилось наличие у пациентов сопутствующих хронических заболеваний. В качестве контроля обследовано 24 практически здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Inc., США) и проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора антител CytoDiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с инструкцией изготовителя:

100 мкл цельной крови инкубировали с 10 мкл красителя CytoDiff в течение 20 мин при комнатной температуре. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ и подсчет процентного и абсолютного количества клеток проводились после регистрации 20 000 лейкоцитов с использованием программы автоматического гейтирования CytoDiff СХР (Beckman Coulter, США) [22].

Диагностика иммунных нарушений осуществлялась на основе методов и приемов, применяемых в клинике инфекционно-воспалительных заболеваний, и результатов лабораторно-иммунологического обследования с помощью метода Hemaflow [1, 2].

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Статистический анализ осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007) и Microsoft Excel 10 (Microsoft, 2010). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 процентов ( $C_{25}$  и  $C_{75}$ ). Достоверность различий между количественными показателями выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. С помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона производили оценку достоверности различий между качественными показателями.

## Результаты

При исследовании популяционного состава гранулярных лейкоцитов с помощью метода Hemaflow у больных онихомикозами обнаружено, что при грибковой инфекции повышено процентное и абсолютное количество юных гранулоцитов ( $SS^{high}CD2-CD16-CD294-CD45^{int}$ ) и увеличено относительное содержание сегментоядерных нейтрофилов ( $SS^{high}CD16^+CD45^{high}$ ) (табл. 1). Необходимо отметить, что такое сопоставление результатов возможно при гейтировании популяций и субпопуляций лейкоцитов с использованием канала для регистрации «бокового» светорассеяния клеток (side scatter, SS). Данный параметр позволяет оценить свет, рассеянный как самой клеткой, так и ее органеллами, локализованными в цитоплазме, что дает возможность охарактеризовать структуру и гранулярность исследуемых лейкоцитов [6].



Процентное и абсолютное содержание общей популяции моноцитов в периферической крови у больных ониомикозами снижено относительно контрольных значений (табл. 2). Однако при оценке субпопуляционного состава моноцитов обнаружено, что если процентное количество «классических» моноцитов ( $SS^{int}CD2^{-}CD16^{-}CD19^{-}CD36^{+}CD294^{-}$ ) повышено по сравнению с контрольным уровнем, то их абсолютное содержание снижено за счет выраженного понижения абсолютного содержания общих моноцитов. Также у больных ониомикозами по сравнению с контрольными значениями снижено относительное и абсолютное содержание «неклассических» моноцитов ( $SS^{int}CD2^{-}CD16^{+}CD19^{-}CD36^{+}CD294^{-}$ ). Разнонаправленное изменение количества основных популяций моноцитов приводит к повышению уровня соотношения «классических» и «неклассических» моноцитов у обследованных пациентов.

Установлено, что при грибковой инфекции снижено процентное и абсолютное количество лимфоцитов (табл. 3). Более того, значительно меняется субпопуляционный состав лимфоидных клеток. Так, у обследованных пациентов в 1,36 раза снижено абсолютное количество Т-лимфоцитов ( $SS^{low}(CD2^{+}$  или  $CD294^{+})CD45^{high}$ ). При микозной инфекции обнаружено понижение относительного и абсолютного содержания популяции В-лимфоцитов ( $SS^{low}CD2^{-}CD16^{-}CD19^{+}CD294^{-}CD45^{high}$ ).

При исследовании фенотипа лейкоцитов крови методом Nematoflow у больных ониоми-

козами в зависимости от локализации грибкового поражения обнаружено, что единственным показателем, по которому выявляются различия у пациентов с поражением стоп и поражением кисти/стоп, является абсолютное содержание Т-лимфоцитов в периферической крови: при поражении стоп —  $n = 32$  (76,2%),  $Me = 1,20 \times 10^9/л$ ,  $C_{25} = 1,12 \times 10^9/л$ ,  $C_{75} = 1,40 \times 10^9/л$ ; при поражении кисти/стоп —  $n = 10$  (33,8%),  $Me = 1,48 \times 10^9/л$ ,  $C_{25} = 1,30 \times 10^9/л$ ,  $C_{75} = 1,60 \times 10^9/л$ ;  $p = 0,045$ . Различия исследуемых показателей с контрольными значениями в группах больных с поражением стоп и поражением кисти/стоп соответствуют представленным для общей группы больных ониомикозами.

Также нами проведено исследование фенотипического состава лейкоцитов периферической крови у больных ониомикозами в зависимости от возбудителя инфекции. Установлено, что единственным показателем, величина которого статистически значимо меняется в зависимости от возбудителя инфекции, является относительное количество моноцитов: при возбудителях рода *Candida* (группа 1) —  $n = 20$  (47,6%),  $Me = 6,5\%$ ,  $C_{25} = 4,7\%$ ,  $C_{75} = 8,2\%$ ; при дерматомицетах (группа 2) —  $n = 11$  (26,2%),  $Me = 7,3\%$ ,  $C_{25} = 6,2\%$ ,  $C_{75} = 7,8\%$ ; при ониобактериозах (группа 3) —  $n = 10$  (23,8%),  $Me = 9,2\%$ ,  $C_{25} = 7,2\%$ ,  $C_{75} = 9,8\%$ . Статистически значимые различия выявляются при сравнении групп 1 и 3, а также 2 и 3 ( $p = 0,011$  в обоих случаях).

При исследовании особенностей фенотипического состава лейкоцитов крови у больных

**ТАБЛИЦА 1. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИОМИКОЗАМИ (ME,  $C_{25}$ — $C_{75}$ )**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Лейкоциты, $10^9/л$	5,85 (4,90–7,05)	6,30 (4,60–7,30)	
Юные, %	0,0 (0,0–0,0)	0,07 (0,04–0,10)	< 0,001
Юные, $10^9/л$	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0039 (0,0024–0,0050)	< 0,001
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,14 (0,08–0,27)	0,10 (0,07–0,18)	
Палочкоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	0,008 (0,004–0,019)	0,006 (0,004–0,012)	
Сегментоядерные нейтрофилы, %	47,6 (42,4–51,9)	52,8 (47,0–58,5)	0,023
Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/л$	2,53 (2,09–3,52)	2,51 (2,24–3,73)	
Эозинофилы, %	3,0 (1,8–4,0)	3,2 (2,2–4,7)	
Эозинофилы, $10^9/л$	0,15 (0,11–0,23)	0,18 (0,12–0,28)	
Базофилы, %	0,55 (0,23–0,74)	0,64 (0,15–0,89)	
Базофилы, $10^9/л$	0,027 (0,016–0,038)	0,038 (0,008–0,056)	

**ТАБЛИЦА 2. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ (МЕ, С<sub>25</sub>–С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Моноциты, %	8,8 (7,6–9,9)	7,2 (6,2–8,9)	0,002
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,52 (0,44–0,60)	0,36 (0,29–0,45)	< 0,001
Моноциты «классические», %	93,5 (91,1–95,5)	96,7 (95,2–98,0)	< 0,001
Моноциты «классические», 10 <sup>9</sup> /л	0,48 (0,41–0,57)	0,33 (0,28–0,45)	< 0,001
Моноциты «неклассические», %	6,5 (4,5–9,0)	3,3 (2,1–4,9)	< 0,001
Моноциты «неклассические», 10 <sup>9</sup> /л	0,029 (0,022–0,049)	0,013 (0,007–0,017)	< 0,001
Моноциты «классические»/ Моноциты «неклассические»	14,37 (10,18–21,10)	29,27 (19,62–47,55)	< 0,001

онихомикозами (в зависимости от продолжительности инфекции) обнаружено, что процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов повышается в группе больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет и остается высоким при длительности более 10-ти лет (табл. 4). Процентное и абсолютное содержание юных гранулоцитов повышено у больных онихомикозами независимо от продолжительности заболевания.

Относительное количество моноцитов в периферической крови больных онихомикозами понижается с периода 3–10 лет, тогда как абсолютное количество клеток уменьшается уже

с периода до 3-х лет и у больных с продолжительностью инфекции более 10-ти лет является минимальным (табл. 5). Процентное содержание «классической» популяции моноцитов повышено при онихомикозах уже с периода до 3-х лет и достигает максимума у больных с продолжительностью инфекции более 10-ти лет. Абсолютное количество моноцитов данной фракции у обследованных пациентов снижается относительно контрольных значений с периода 3–10 лет. Процентное и абсолютное количество «неклассических» моноцитов у больных онихомикозами снижено относительно контрольных значений

**ТАБЛИЦА 3. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОНИХОМИКОЗАМИ (МЕ, С<sub>25</sub>–С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	Больные (n = 42)	p
Лимфоциты, %	37,9 (33,4–44,5)	34,1 (29,5–39,8)	0,044
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,23 (1,88–2,62)	1,67 (1,49–2,11)	< 0,001
Т-лимфоциты, %	74,1 (72,0–76,6)	76,2 (72,2–82,7)	
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,73 (1,37–2,07)	1,27 (1,13–1,51)	< 0,001
Незрелые Т-лимфоциты, %	0,06 (0,02–0,15)	0,48 (0,02–0,75)	
Незрелые Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,001 (0,0004–0,0046)	0,0063 (0,0004–0,0114)	
В-лимфоциты, %	11,5 (10,2–13,7)	8,3 (5,1–13,1)	0,021
В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,27 (0,21–0,32)	0,14 (0,08–0,24)	< 0,001
Незрелые В-лимфоциты, %	0,05 (0,03–0,07)	0,02 (0,01–0,03)	< 0,001
Незрелые В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,0010 (0,0006–0,0018)	0,0003 (0,0002–0,0005)	< 0,001
НК-клетки, %	12,8 (10,5–16,4)	12,0 (6,8–18,8)	
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л	0,32 (0,22–0,39)	0,24 (0,15–0,34)	

**ТАБЛИЦА 4. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	5,85 (4,90–7,05)	5,90 (4,70–6,95)	6,75 (5,70–7,30)	4,60 (3,75–6,65)
Юные, %	0,0 (0,0–0,0)	0,09 (0,06–0,11)***	0,06 (0,04–0,08)***	0,07 (0,04–0,10)***
Юные, 10 <sup>9</sup> /л	0,0000 (0,0000–0,0000)	0,0045 (0,0035–0,0062)***	0,0039 (0,0021–0,0049)***	0,0028 (0,0020–0,0057)***
Палочкоядерные нейтрофилы, %	0,14 (0,08–0,27)	0,09 (0,06–0,13)	0,11 (0,06–0,18)	0,13 (0,09–0,58)
Палочкоядерные нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,008 (0,004–0,019)	0,005 (0,004–0,007)	0,007 (0,004–0,012)	0,007 (0,005–0,033)
Сегментоядерные нейтрофилы, %	47,6 (42,4–51,9)	50,7 (46,8–53,8)	53,7 (50,1–58,5)*	57,3 (49,8–61,8)*
Сегментоядерные нейтрофилы, 10 <sup>9</sup> /л	2,53 (2,09–3,52)	2,48 (2,29–3,33)	2,70 (2,26–4,73)	2,71 (1,84–4,38)
Эозинофилы, %	3,0 (1,8–4,0)	2,9 (1,8–3,2)	4,2 (2,6–5,6)	3,9 (2,4–6,4)
Эозинофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,15 (0,11–0,23)	0,13 (0,12–0,21)	0,23 (0,12–0,35)	0,19 (0,13–0,24)
Базофилы, %	0,55 (0,23–0,74)	0,86 (0,33–0,99)	0,57 (0,12–0,88)	0,35 (0,12–0,83)
Базофилы, 10 <sup>9</sup> /л	0,027 (0,016–0,038)	0,044 (0,023–0,056)	0,032 (0,006–0,063)	0,021 (0,007–0,038)

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  статистически значимые различия с контрольными показателями.

уже с периода до 3-х лет и достигает минимума при продолжительности инфекции более 10-ти лет. В связи с этим, соотношение содержания «классических» и «неклассических» моноцитов при грибковой инфекции повышено с периода до 3-х лет и достигает максимума при продолжительности заболевания более 10-ти лет.

Относительное и абсолютное количество лимфоцитов, а также абсолютный уровень

T-лимфоцитов в периферической крови больных онхомикозами понижается при продолжительности инфекции 3–10 лет и остается сниженным у пациентов с продолжительностью заболевания более 10-ти лет (табл. 6). Процентное и абсолютное содержание незрелых T-лимфоцитов (SS<sup>low</sup>CD2<sup>+</sup>(CD16<sup>-</sup> или CD294<sup>-</sup>)CD45<sup>low</sup>) понижается при продолжительности заболевания 3–10 лет относительно уровней,

**ТАБЛИЦА 5. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Моноциты, %	8,8 (7,6–9,9)	7,7 (6,4–9,4)	7,1 (6,2–8,9)*	6,5 (4,2–7,1)**
Моноциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,52 (0,44–0,60)	0,41 (0,34–0,54)*	0,38 (0,29–0,45)**	0,30 (0,19–0,33)***
Моноциты «классические», %	93,5 (91,1–95,5)	96,2 (95,2–97,5)**	97,1 (93,1–98,1)**	98,1 (96,5–98,6)**
Моноциты «классические», 10 <sup>9</sup> /л	0,48 (0,41–0,57)	0,39 (0,32–0,51)	0,35 (0,28–0,45)**	0,29 (0,18–0,32)***
Моноциты «неклассические», %	6,5 (4,5–9,0)	3,8 (2,5–4,9)**	3,0 (2,0–7,0)**	1,9 (1,4–3,6)***♦
Моноциты «неклассические», 10 <sup>9</sup> /л	0,029 (0,022–0,049)	0,015 (0,008–0,022)***	0,015 (0,005–0,017)***	0,007 (0,004–0,008)***♦
Моноциты «классические»/ моноциты «неклассические»	14,37 (10,18–21,10)	25,33 (19,60–38,60)**	33,23 (13,37–48,07)**	51,13 (30,54–70,28)***♦

**Примечание:** \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$  статистически значимые различия с контрольными показателями; # —  $p < 0,05$  статистически значимые различия с показателями больных с продолжительностью онхомикозов до 3-х лет; ♦ —  $p < 0,05$  статистически значимые различия с показателями больных с продолжительностью онхомикозов 3–10 лет.

**ТАБЛИЦА 6. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬЮ ОНИХОМИКОЗОВ (МЕ, С<sub>25</sub>—С<sub>75</sub>)**

Показатели	Контроль (n = 24)	До 3-х лет (n = 16)	3–10 лет (n = 18)	Более 10-ти лет (n = 8)
Лимфоциты, %	37,9 (33,4–44,5)	36,0 (32,3–44,3)	34,1 (31,3–38,0)*	31,5 (25,6–34,9)*
Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	2,23 (1,88–2,62)	1,85 (1,57–2,24)	1,66 (1,49–2,01)**	1,43 (1,22–1,65)***#
Т-лимфоциты, %	74,1 (72,0–76,6)	76,9 (71,5–83,1)	75,7 (71,1–82,7)	77,5 (74,1–83,6)
Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	1,73 (1,37–2,07)	1,33 (1,13–1,61)	1,36 (1,13–1,51)**	1,18 (0,90–1,29)**
Незрелые Т-лимфоциты, %	0,06 (0,02–0,15)	0,38 (0,01–0,88)	0,04 (0,02–0,59)#	0,68 (0,50–0,86)* ♦
Незрелые Т-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,001 (0,0004–0,0046)	0,0042 (0,0002–0,0086)	0,0011 (0,0003–0,0072)#	0,0098 (0,0048–0,0121)***# ♦
В-лимфоциты, %	11,5 (10,2–13,7)	11,3 (7,21–13,4)	7,2 (4,3–12,9)**	6,3 (4,8–10,4)*
В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,27 (0,21–0,32)	0,20 (0,12–0,31)	0,16 (0,08–0,24)*	0,09 (0,07–0,12)***# ♦
Незрелые В-лимфоциты, %	0,05 (0,03–0,07)	0,02 (0,02–0,05)*	0,01 (0,01–0,02)***#	0,03 (0,02–0,04)* ♦
Незрелые В-лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	0,0010 (0,0006–0,0018)	0,0004 (0,0002–0,0010)**	0,0003 (0,0002–0,0003)***#	0,0004 (0,0003–0,0005)**
НК-клетки, %	12,8 (10,5–16,4)	12,9 (6,0–18,6)	12,0 (9,1–18,8)	11,7 (9,2–19,5)
НК-клетки, 10 <sup>9</sup> /л	0,32 (0,22–0,39)	0,26 (0,15–0,33)	0,22 (0,15–0,40)	0,20 (0,14–0,26)

**Примечание:** то же, что и для табл. 5.

выявленных у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет. При продолжительности инфекции более 10-ти лет содержание незрелых Т-лимфоцитов повышается как относительно контрольных значений, так и уровней, выявленных у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет. Процентное содержание В-лимфоцитов снижается с периода инфекции 3–10 лет. В то же время, абсолютное количество В-лимфоцитов также снижается с периода инфекции 3–10 лет, но у больных с продолжительностью заболевания более 10-ти лет является минимальным. Процентное и абсолютное количество незрелых В-лимфоцитов у больных с онихомикозами снижено относительно контрольных значений, но у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет является минимальным по сравнению с другими периодами заболевания.

## Обсуждение

К настоящему времени вопрос об иммунной составляющей в патогенезе грибковой инфекции полностью еще не разрешен. Известно, что антигены грибов обладают слабой иммуногенностью [4, 30]. Основные защитные механизмы

реализуются за счет клеточных звеньев системы неспецифической резистентности и адаптивного иммунитета. Действительно, при обследовании больных онихомикозами обнаружено повышение количества юных гранулоцитов, невыраженная реакция со стороны нейтрофильных гранулоцитов и снижение уровня моноцитов в периферической крови. Необходимо отметить, что у большинства обследованных пациентов отмечается длительное течение грибковой инфекции, поэтому ожидать более выраженной реакции со стороны гранулоцитов не приходится.

Кроме полной характеристики популяционного состава гранулоцитов крови, метод *Nemato-flow* позволяет охарактеризовать субпопуляционный состав моноцитов. Все циркулирующие моноциты по фенотипическим характеристикам делятся на две основные субпопуляции, различающиеся по уровню экспрессии CD16. CD16-антиген является низкоаффинным Fc-рецептором для IgG [9, 14, 19]. Моноциты, не экспрессирующие CD16-антиген, определяются как «классические» [5, 8, 18]. Данная фракция представлена крупными клетками с высоким уровнем фагоцитарной активности. Для данной субпопуляции характерны повышенный уровень



экспрессии CCR2, CD36, CD64, CD62L и низкий уровень синтеза фактора некроза опухоли- $\alpha$  и интерлейкина-1, а также высокая активность ферментов, осуществляющих «респираторный взрыв» [12, 20, 28]. «Неклассические» моноциты (экспрессирующие CD16-антиген) определяются как сравнительно небольшие клетки с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью, и, соответственно, с пониженным уровнем «респираторного взрыва». На их поверхности хорошо представлены CX3CR1, CD11c и HLA-DR, тогда как CD62L и CD64 практически отсутствуют [31]. Соответственно, повышение количества «классических» моноцитов и снижение содержания «неклассических» моноцитов (что также подтверждается уровнем их соотношения) у больных онихомикозами можно определить как реакцию иммунитета на возбудитель, отражающую значимость фагоцитарных процессов в иммунопатогенезе заболевания. Примечательно, что изменение субпопуляционного состава моноцитов проявляется уже в группе больных с длительностью инфекции до 3-х лет. Следовательно, вовлечение данной фракции клеток в иммунопатогенез онихомикозов, по-видимому, осуществляется с момента попадания патогена.

При анализе популяционного состава лимфоцитов периферической крови обнаружено, что лимфопения у больных онихомикозами является следствием преимущественного снижения количества В-лимфоцитов (как зрелых, так и незрелых форм). Причем, при анализе популяционного состава лимфоцитов крови при грибковой инфекции установлено, что содержание незрелых В-лимфоцитов снижается уже у больных с продолжительностью заболевания до 3-х лет, тогда как уровень зрелых В-лимфоцитов понижается у больных с продолжительностью инфекции 3–10 лет и более 10-ти лет. Также обнаружено, что количество незрелых Т-лимфоцитов значительно повышается у больных с продолжительностью заболевания более 10-ти лет. Защитная роль гуморального иммунитета при микозах не выражена [4, 23, 29]. В связи с этим можно предположить, что с начала инфекционного процесса запускаются иммунные механизмы, ингибирующие В-лимфопоэз. В то же время длительная персистенция грибов в организме стимулирует реакцию со стороны Т-клеточного звена иммунитета, что и проявляется в повышении количества Т-лимфоцитов у больных онихомикозами с продолжительностью инфекции более 10-ти лет.

На основе клинико-иммунологического анамнеза и лабораторных результатов, у больных онихомикозами определялись механизм и уровень повреждения иммунной системы, а также степень тяжести иммунопатологического процесса [1, 2]. Обнаружено, что у большинства пациентов

выявляется гипореактивный механизм повреждения иммунной системы (34 (81,0%), сочетанный механизм — у 8 (19,0) больных,  $p < 0,001$ ). Клеточно-эффекторный уровень повреждения выявлялся у 32 (76,2%) обследованных пациентов, тогда как комбинированный — у 10 (23,8%) ( $p < 0,001$ ). Макрофагально-фагоцитарный, гуморально-эффекторный и регуляторный уровень повреждения иммунной системы у больных онихомикозами не выявлялся. С легкой степенью тяжести повреждения иммунной системы выявлялось 22 (52,3%) пациента, со среднетяжелой — 18 (42,9%), с тяжелой степенью — 2 (4,8%). Учитывая, что диагностика и дальнейшая коррекция иммунных нарушений необходима для назначения эффективной терапии при онихомикозах, можно рекомендовать метод Nematoflow как комплексный метод оценки врожденного и адаптивного иммунитета в дерматологической практике.

Таким образом, оценка фенотипического состава лейкоцитов с помощью метода Nematoflow позволила установить у больных онихомикозами нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета. Обнаружены незначительные изменения в популяционном составе гранулярных лейкоцитов в периферической крови больных, выражающиеся в увеличении содержания юных и сегментоядерных гранулоцитов. На фоне моноцитопении, у больных онихомикозами повышается содержание «классических» моноцитов и снижается уровень «неклассических» моноцитов. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов выявляются у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет и сохраняются в течение всего заболевания. Наиболее выраженные изменения у больных онихомикозами обнаружены со стороны показателей адаптивного иммунитета. Лимфопения у данных больных реализуется за счет снижения количества незрелых и зрелых В-клеток, на фоне повышения содержания Т-лимфоцитов. Причем если содержание незрелых В-клеток снижается уже у больных с продолжительностью инфекции до 3-х лет, то изменение количества зрелых Т- и В-лимфоцитов выявляется при продолжительности заболевания 3–10 и более 10 лет. Данные изменения в содержании Т- и В-лимфоцитов отражают иммунопатогенетические процессы и определяют значимость Т- и В-клеточного иммунитета при онихомикозах. В целом, метод Nematoflow является информативным в оценке нарушения состояния клеточного врожденного и адаптивного иммунитета и он позволяет оценивать степень тяжести иммунопатологического процесса, механизм и уровень повреждения иммунной системы; можно рекомендовать его применение для персонализированного подхода к назначению иммуноотропного лечения.

## Список литературы/References

1. Борисов А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 1. С. 45–50. [Borisov A.G. Clinical characteristics of the dysfunction of the immune system. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 45–50. doi: 10.15789/1563-0625-2013-1-45-50 (In Russ.)]
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал. 2008. Т. 23, № 3. С.13–18. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Smirnova S.V. On the classification of violations of the functional state of the immune system. *Sibirskii meditsinskii zhurnal = Siberian Medical Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 13–18. (In Russ.)]
3. Васенова В.Ю., Пичугин А.В., Бутов Ю.С., Атауллаханов Р.И. Влияние комплексной терапии онихомикоза на клинико-иммунологические параметры. Сообщение 3 // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2008. № 2. С. 48–51. [Vasenova V.Ju., Pichugin A.V., Butov Ju.S., Ataullahanov R.I. Influence of complex therapy for onychomycosis clinical and immunological parameters. Message 3. *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2008, no. 2, pp. 48–51. (In Russ.)]
4. Васенова В.Ю., Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Бутов Ю.С. Особенности иммунного статуса больных онихомикозом. Сообщение 1 // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2007. № 4. С. 63–66. [Vasenova V.Ju., Ataullahanov R.I., Pichugin A.V., Butov Ju.S. Features of the immune status of patients with onychomycosis. Message 1. *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2007, no. 4, pp. 63–66. (In Russ.)]
5. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 305–312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudryavtsev I.V., Grigor'ev E.V., Velikanova E.A., Bajrakova Ju.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 305–312. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-305-312 (In Russ.)]
6. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: Редакционно-издательский отдел Уральского отделения РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Hajdukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshev V.A. *Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii* [Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: Publishing department of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2013. 552 p.]
7. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н., Шадривова О.В., Борзова Ю.В., Васильева Н.В. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели Life program // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16, № 1. С. 3–8. [Klimko N.N., Kozlova Ja.I., Hostelidi S.N., Shadrivova O.V., Borzova Ju.V., Vasil'eva N.V. The incidence of severe and chronic mycotic diseases in the Russian Federation on the model of Life program. *Problemy meditsinskoi mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 3–8. (In Russ.)]
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошеев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 141–150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. The phenotypic composition and chemiluminescent activity of monocytes in patients with renal cell cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150 (In Russ.)]
9. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ НК- и НКТ-клеток у больных почечноклеточным раком // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1012–1018. [Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V., Tonacheva O.G., Borisov A.G. The cytometric analysis NK- and NKT-cells in patients with renal cell cancer. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8 (17), no. 4, pp. 1012–1018. (In Russ.)]
10. Сергеев Ю.В., Касихина Е.И. Онихомикозы: современные подходы к лечению // Вестник дерматологии и венерологии. 2009. № 5. С. 117–119. [Sergeev Ju.V., Kasikhina E.I. Onychomycosis: modern approaches to treatment. *Vestnik dermatologii i venerologii = Journal of Dermatology and Venereology*, 2009, no. 5, pp. 117–119. (In Russ.)]
11. Ameen M., Lear J.T., Madan V., Mohd Mustapa M.F., Richardson M. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of onychomycosis 2014. *Br. J. Dermatol.*, 2014, vol. 171, no. 5, pp. 937–958. doi: 10.1111/bjd.13358
12. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, vol. 152, no. 1, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.004
13. Baraldi A., Jones S.A., Guesné S., Traynor M.J., McAuley W.J., Brown M.B., Murdan S. Human nail plate modifications induced by onychomycosis: implications for topical therapy. *Pharm. Res.*, 2015, vol. 32, no. 5, pp. 1626–1633. doi: 10.1007/s11095-014-1562-5
14. Bhatnagar N., Ahmad F., Hong H.S., Eberhard J., Lu I.N., Ballmaier M., Schmidt R.E., Jacobs R., Meyer-Olson D. FcγRIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcγRII (CD32). *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 11, pp. 3368–3379. doi: 10.1002/eji.201444515
15. Brasch J., Köppl G. Persisting onychomycosis caused by *Fusarium solani* in an immunocompetent patient. *Mycoses*, 2009, vol. 52, no. 3, pp. 285–286. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01591.x
16. Bruserud O. Bidirectional crosstalk between platelets and monocytes initiated by Toll-like receptor: an important step in the early defense against fungal infections? *Platelets*, 2013, vol. 24, no. 2, pp. 85–97. doi: 10.3109/09537104.2012.678426
17. Bunyaratavej S., Pattanaprichakul P., Leeyaphan C., Chayangsu O., Bunyaratavej S., Kulthanan K. Onychomycosis: a study of self-recognition by patients and quality of life. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2015, vol. 81, no. 3, pp. 270–274. doi: 10.4103/0378-6323.154796
18. Burbano C., Vasquez G., Rojas M. Modulatory effects of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes on CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes: a possible explanation of monocyte alterations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, vol. 66, no. 12, pp. 3371–3381. doi: 10.1002/art.38860

19. Döbel T., Kunze A., Babatz J., Tränkner K., Ludwig A., Schmitz M., Enk A., Schäkel K. FcγRIII (CD16) equips immature 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells (slanDCs) with a unique capacity to handle IgG-complexed antigens. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 18, pp. 3609–3618. doi: 10.1182/blood-2012-08-447045
20. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*. 2012, vol. 381, no. 1–2, pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.003
21. Jo Y., Kim S.H., Koh K., Park J., Shim Y.B., Lim J., Kim Y., Park Y.J., Han K. Reliable, accurate determination of the leukocyte differential of leukopenic samples by using Hematoflow method. *Korean J. Lab. Med.*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 131–137. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.3.131
22. Kahng J., Kim Y., Kim M., Oh E.J., Park Y.J., Han K. Flow cytometric white blood cell differential using CytoDiff is excellent for counting blasts. *Ann. Lab. Med.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 28–34. doi: 10.3343/alm.2015.35.1.28
23. Kaya T.I., Eskandari G., Guvenc U., Gunes G., Tursen U., Burak Cimen M.Y., Ikizoglu G. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells in patients with toenail onychomycosis. *Arch. Dermatol. Res.*, 2009, vol. 301, no. 10, pp. 725–729. doi: 10.1007/s00403-009-0941-y
24. Kim A.H., Lee W., Kim M., Kim Y., Han K. White blood cell differential counts in severely leukopenic samples: a comparative analysis of different solutions available in modern laboratory hematology. *Blood Res.*, 2014, vol. 49, no. 2, pp. 120–126. doi: 10.5045/br.2014.49.2.120
25. Leelavathi M., Noorlaili M. Onychomycosis nailed. *Malays Fam. Physician.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 2–7.
26. Lipner S.R., Scher R.K. Onychomycosis: current and investigational therapies. *Cutis*, 2014, vol. 94, no. 6, pp. 21–24.
27. Rosen T., Friedlander S.F., Kircik L., Zirwas M.J., Stein Gold L., Bhatia N., Gupta A.K. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. *J. Drugs Dermatol.*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 223–233.
28. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 67, no. 2, pp. 152–159. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
29. Trzeciak-Ryzek A., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W. Antifungal immunity in selected fungal infections. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2015, vol. 69, pp. 469–474 doi: 10.5604/17322693.1148747
30. Wüthrich M., Brandhorst T.T., Sullivan T.D., Filutowicz H., Sterkel A., Stewart D., Li M., Lerksuthirat T., LeBert V., Shen Z.T., Ostroff G., Deepe G.S. Jr, Hung C.Y., Cole G., Walter J.A., Jenkins M.K., Klein B. Calnexin induces expansion of antigen-specific CD4(+) T cells that confer immunity to fungal ascomycetes via conserved epitopes. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, no. 4, pp. 452–465. doi: 10.1016/j.chom.2015.02.009
31. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 16, pp. 74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558

**Авторы:**

**Савченко А.А.**, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Борисов А.Г.**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Анисимова Е.Н.**, к.м.н., зав. кафедрой ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;  
**Беленюк В.Д.**, аспирант ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;  
**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург; старший научный сотрудник кафедры фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, Россия;  
**Решетников И.В.**, биолог иммунологической лаборатории ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Квятковская С.В.**, к.м.н., зав. лабораторией ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Цейликман В.Э.**, д.б.н., профессор, зав. кафедрой ГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Челябинск, Россия;  
**Зорин А.Н.**, клинический миколог КГБУЗ Красноярский краевой кожно-венерологический диспансер № 1, г. Красноярск, Россия.

**Authors:**

**Savchenko A.A.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Borisov A.G.**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular-Cell Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Anisimova E.N.**, PhD (Medicine), Head of the Department, Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voyno-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Belenyuk V.D.**, PhD Candidate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;  
**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Senior Researcher, Department of Fundamental Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation;  
**Reshetnikov I.V.**, Biologist of the Immunology Laboratory, South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Kvjatkovskaja S.V.**, PhD (Medicine), Head of the Laboratory, South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Cejlikman V.Je.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department South Ural State Medical University, Cheljabinsk, Russian Federation;  
**Zorin A.N.**, Clinical Mycologist, Krasnoyarsk Regional Sexually Transmitted Infection Clinic No. 1, Krasnoyarsk, Russian Federation.

# ЦИТОКИНЫ И ГЕРПЕСВИРУСЫ ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ У ДЕТЕЙ

Г.Ф. Железникова, Н.В. Скрипченко, Г.П. Иванова, А.В. Суровцева,  
Н.Е. Монахова

ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Ранее установлено (Г.П. Иванова, 2012), что у подростков хроническое течение лейкоэнцефалита, обусловленное неадекватным ответом системы цитокинов на сочетание двух герпесвирусов (ГВ) — EBV и HHV-6, в 44% случаев приводит к развитию РС. Цель исследования состояла в характеристике ответа цитокинов у детей с РС с одновременным скринингом наличия у них активной ГВ-инфекции. Под наблюдением были 39 детей с диагнозом «РС»; из них 34 переносили рецидивирующий-ремиттирующий (РР) РС, а 5 имели прогрессирующее течение РС (ПРС). Концентрации цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4 определяли в сыворотке крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) методом ИФА, ДНК ГВ выявляли в ПЦР. Цитокиновый статус детей с РС имел отличия в зависимости от фазы болезни, клинической тяжести обострения и течения процесса. Период обострения РРРС ассоциирован с накоплением в крови IL-8, IL-10 и IL-6, модуляциями индекса IFN $\gamma$ /IL-4 по мере роста клинической тяжести обострения. Тяжелое обострение болезни у детей с ПРС сопровождалось усилением системного ответа IL-8. ДНК герпесвирусов выявлена у 27 из 39 (69%) пациентов в крови и у 17 (44%) в ЦСЖ, с доминированием EBV (93%), часто в сочетании с HHV-6. В периоде обострения частота обнаружения ДНК ГВ нарастала в 2–3 раза по сравнению с периодом ремиссии. В отличие от детей с РРРС, у всех 5 пациентов с ПРС обнаружена микст-инфекция из 3–4 герпесвирусов. По совокупности результатов исследования можно заключить, что ГВ-инфекция играет важную роль в патогенезе РС у подростков, участвуя в обострении и прогрессии болезни путем воздействия на системный ответ цитокинов. Среди ГВ доминирует EBV-инфекция, однако риск развития РС резко нарастает при сочетании EBV с другим лимфотропным вирусом — HHV-6.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, герпесвирусы, иммунный ответ, цитокины, ВЭБ-инфекция, дети.

## CYTOKINES AND HERPESVIRUSES IN CHILDREN WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Surovtseva A.V., Monakhova N.E.

Scientific and Research Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** It was determined earlier (G.P. Ivanova, 2012) that a chronic course of leukoencephalitis in teenagers caused by inadequate response of cytokine system to the combination of two herpesviruses (HV) — EBV and HHV-6, leads to the development of multiple sclerosis (MS) in 44% of cases. The research objective was to characterize the cytokine response in children with MS with simultaneous screening of the presence of active HV infections. 39 children with the diagnosis “MS” were under observation, 34 of them had relapsing-remitting (RR) MS, and 5 children had a progressing course of MS (PMS). Concentration of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and IL-4 was identified in blood se-

---

**Адрес для переписки:**

Железникова Галина Федоровна  
197002, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 9,  
ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России.  
Тел.: 8 905 267-41-32 (моб.).  
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

**Contacts:**

Galina F. Zheleznikova  
194223, Russian Federation, St. Petersburg, Prof. Popova str., 9,  
Scientific and Research Institute of Children's Infections.  
Phone: 8 905 267-41-32 (mobile).  
E-mail: zheleznikova.galina@gmail.com

**Библиографическое описание:**

Железникова Г.Ф., Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Суровцева А.В.,  
Монахова Н.Е. Цитокины и герпесвирусы при рассеянном склерозе  
у детей // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 349–358.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-349-358

**Citation:**

Zheleznikova G.F., Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Surovtseva A.V.,  
Monakhova N.E. Cytokines and herpesviruses in children with multiple  
sclerosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet,  
2015, vol. 5, no. 4, pp. 349–358. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-349-358



rum and cerebrospinal liquid (CSF) by enzyme-linked immunosorbent assay, HV DNA was revealed by PCR. Cytokine status in children with MS had some differences depending on the phase of the disease, clinical severity of the relapse and the course of MS. The relapse phase of RRMS was associated with the accumulation of IL-8, IL-10, and IL-6 in the blood, and index IFN $\gamma$ /IL-4 modulations in accordance with the clinical severity of the relapse. A severe aggravation of the disease in children with PMS was accompanied by the increase of IL-8 system response. HV DNA was revealed in 27 patients from 39 ones (69%) in blood and in 17 patients (44%) in CSF with the predominance of EBV (93%), frequently in combination with HHV-6. During an acute period the frequency of HV DNA identification increased 2–3 times to compare with the remission period. Unlike children with RRMS, a mixed-infection of 3–4 herpes viruses was revealed in all 5 patients with PMS. According to the results summary it is possible to make a conclusion that HV-infection has an important role in MS pathogenesis in teenagers, taking part in the aggravation and progression of the disease by its effect on the cytokine system response. EBV-infection dominates among HV, however the risk of MS development increases to a great extent in the case of EBV association with another lymphotropic virus — HHV-6.

**Key words:** multiple sclerosis, herpesviruses, immune responses, cytokines, EBV-infection, children.

## Введение

Рассеянный склероз (РС) — хроническое воспалительно-демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), чаще развивается в молодом возрасте, характеризуется прогрессирующим течением с нарастанием неврологического дефицита, приводящим к инвалидизации, с возможным летальным исходом. Основным вариантом течения РС — рецидивирующий-ремиттирующий (PPPC) — развивается более чем в 80% случаев, но наименее благоприятны прогрессирующие формы рассеянного склероза (ПРС) (вторично прогрессирующий, первично прогрессирующий и прогрессирующий с обострениями). РС причисляют к аутоиммунным заболеваниям ЦНС, но в последнее десятилетие все большее внимание привлекает участие инфекционных агентов, в частности, вирусов группы герпес в этиопатогенезе РС. Известны два наиболее реальных кандидата на эту роль — вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ, EBV) и вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6, HHV-6), обладающие способностью к молекулярной мимикрии и индукции Т-клеток с двойной специфичностью: к пептидам вируса и основному белку миелина (ОБМ). Важно, что среди перекрестно реагирующих Т-клеток имеются CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, которые способны вызывать прямое повреждение олигодендроцитов, экспрессирующих одновременно ОБМ и HLA I класса [12]. Обострения РС связывают с реактивацией EBV вследствие дефицита Т-клеточного контроля репликации латентного вируса, что особенно важно в начальной стадии болезни [18, 19].

Особую медико-социальную проблему представляет РС у детей. Комплексное исследование вирусных лейкоэнцефалитов (ЛЭ) показало, что хроническое течение болезни у подростков, чаще всего обусловленное сочетанием EBV и HHV-6, в 44% случаев приводит к развитию РС [10]. При этом хроническое течение ЛЭ тесно связано с дефицитом ответа системы цитокинов на вирусную инфекцию [5]. В на-

стоящее время активно изучается роль цитокинов врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе РС, однако данные о связи ответа цитокинов с клиническими параметрами РС противоречивы [20, 26].

Цель исследования состояла в характеристике системного и локального ответа цитокинов при разных клинических проявлениях РС, с одновременным скринингом наличия активной герпесвирусной инфекции.

## Материалы и методы

Иммунологическое обследование проведено 39 детям в возрасте от 9 до 17 лет, поступившим в отделение нейроинфекций и органической патологии нервной системы НИИДИ с диагнозом «РС», которые в дальнейшем наблюдались в СПб Центре рассеянного склероза (руководитель — к.м.н. Евдошенко Е.П.). Основную группу обследованных больных составили дети с PPPC (n = 34), пятеро подростков в возрасте от 14 до 17 лет имели ПРС с давностью болезни менее 2 лет. Клинико-неврологическое обследование пациентов включало балльную оценку неврологического статуса по международной расширенной шкале степени инвалидизации (EDSS). Концентрации цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4 определяли в сыворотке крови и ЦСЖ методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Содержание в сыворотках крови общего иммуноглобулина E (IgE) определяли методом ИФА с помощью тест-систем ООО «Алкор Био» (Санкт-Петербург). Контрольную группу составили практически здоровые дети соответствующего возраста (n = 10). Серологическая диагностика герпесвирусной инфекции включала определение вирусспецифических антител классов IgM и IgG в ИФА с применением тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). Образцы сывороток крови и ЦСЖ пациентов тестировали также на присутствие ДНК гер-

песвирусов 1, 2, 3, 4, 5 и 6-го типов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2003–2007 и Statistica 7 для Windows. Оценку достоверности различий осуществляли с помощью параметрических и непараметрических методов вариационной статистики. Достоверными различия считали при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Цитокины в сыворотке крови и ликворе детей с рассеянным склерозом

Основной задачей исследования была характеристика системного ответа цитокинов врожденного (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN $\alpha$ ) и адаптивного иммунитета (IFN $\gamma$  и IL-4) в зависимости от фазы болезни и тяжести обострения, оцененной в баллах по шкале EDSS (Expanded Disability Status Scale), у детей основной группы с РРРС (табл. 1). В периоде ремиссии сывороточные уровни провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6, а также цитокина Th2-типа IL-4 были значительно ниже показателей у практически здоровых детей, тогда как содержание IL-8, IL-10, IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  оставалось в пределах нормы. Легкое обострение болезни сопровождалось тенденцией к накоплению в циркуляции (относительно нормы) IFN

обоих типов и IL-10, при росте концентраций IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 и IFN $\gamma$  (но не IL-4) по сравнению с показателями в периоде ремиссии, не достигая, однако, степени достоверности. При обострении средней тяжести имело место значительное накопление в циркуляции двух цитокинов — IL-8 и IL-10, содержание которых многократно превышало нормы и возросло примерно в 5 раз (по средним данным) по сравнению с показателями при легком обострении. Дефицит IL-4 относительно базального уровня при этом сохранялся. Только у детей с обострением тяжелой степени отмечен значительный выход в циркуляцию IL-6, с 5-кратным превышением нормы. Тяжелое обострение сопровождалось также усиленной продукцией IL-8 с 15-кратным ростом средних концентраций цитокина относительно нормы и легкого обострения, при одновременном повышении ответа IL-10 с возрастанием его уровня в 8 раз по сравнению с обострением легкой степени тяжести. Тяжелое обострение РРРС у 3 из 6 больных характеризовалось значительным усилением системной продукции IFN $\gamma$ .

Большой интерес представляет нелинейная модуляция индекса IFN $\gamma$ /IL-4, рассчитанного по средним данным и ориентировочно отражающего баланс Th1/Th2 ответов в зависимости от тяжести обострения РРРС. Легкое обострение характеризовалось повышением индекса IFN $\gamma$ /IL-4 с 3,6 до 10,4, то есть значительным

**ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В КРОВИ И ЦСЖ ПРИ РАЗНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЯХ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА У ДЕТЕЙ**

№	Группа пациентов	n	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	IL-10	IFN $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-4
Цитокины в сыворотке крови									
1	РРРС, ремиссия	13	8,2 $\pm$ 4,1*	6,5 $\pm$ 1,3*	54 $\pm$ 24	3,5 $\pm$ 2,2	23 $\pm$ 8	36 $\pm$ 10	10 $\pm$ 3*
2	РРРС, легкое обострение (до 2,5 баллов)	11	35 $\pm$ 14	29 $\pm$ 14	55 $\pm$ 17	29 $\pm$ 16	36 $\pm$ 13	52 $\pm$ 15	5,1 $\pm$ 1,1*
3	РРРС, среднетяжелое обострение (3,5–5,5 баллов)	17	35 $\pm$ 12	42 $\pm$ 24	259 $\pm$ 39*	137 $\pm$ 24*	10 $\pm$ 2	47 $\pm$ 27	11 $\pm$ 4*
4	РРРС, тяжелое обострение (> 6 баллов)	6	89 $\pm$ 43	222 $\pm$ 79*	804 $\pm$ 55*	247 $\pm$ 44*	25 $\pm$ 8	201 $\pm$ 114	16 $\pm$ 7*
–	$p < 0,05$ и менее	–	–	1, 2, 3–4	1, 2, 3–4 1, 2–3	1, 2, 3–4 1, 2–3	–	–	–
5	ПРС, обострение	5	36 $\pm$ 23	342 $\pm$ 129	1539 $\pm$ 278*	301 $\pm$ 81*	91 $\pm$ 40*	1100 $\pm$ 544*	57 $\pm$ 32
–	Норма	10	27 $\pm$ 7	48 $\pm$ 10	49 $\pm$ 11	4,8 $\pm$ 2,8	10 $\pm$ 7	26 $\pm$ 8	51 $\pm$ 7
Цитокины в цереброспинальной жидкости									
1	РРРС, ремиссия	4	3,2 $\pm$ 1,1	6,5 $\pm$ 2,7	н.д.	н.д.	н.д.	6,5 $\pm$ 4,3	1,5 $\pm$ 2,1
2	РРРС, легкое обострение (до 2,5 баллов)	7	1,2 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 2,3	н.д.	33 $\pm$ 6,4	6,9 $\pm$ 2,7
3	РРРС, среднетяжелое обострение (3,5–5,5 баллов)	7	1,5 $\pm$ 0,8	25 $\pm$ 15	0,5 $\pm$ 0,2	37 $\pm$ 12	25 $\pm$ 8	29 $\pm$ 9,1	25 $\pm$ 13,6
–	$p < 0,05$	–	–	–	–	2–3	–	2 и 3–1	–
5	ПРС, обострение	4	17 $\pm$ 17	34 $\pm$ 5,5	н.д.	81 $\pm$ 80	13 $\pm$ 11	19 $\pm$ 8,9	30 $\pm$ 14

**Примечания:** РРРС — рецидивирующе-ремиттирующий РС; ПРС — прогрессирующий РС; н.д. — нет данных;

\* — достоверное отличие от нормы при  $p$  по крайней мере  $< 0,05$ .

смещением баланса в сторону Th1 по сравнению с фазой ремиссии. Эту мысль подтверждает снижение уровня общего IgE до  $63 \pm 20$  кЕ/л против  $154 \pm 52$  кЕ/л в фазе ремиссии (при норме  $100 \pm 32$  кЕ/л). Дальнейшее усиление воспалительного процесса в ЦНС с развитием обострения средней степени тяжести сопровождалось обратной тенденцией с уменьшением индекса  $IFN\gamma/IL-4$  до 4,3. Это позволяет предположить, что усугубление клинической тяжести обострения РС связано с усилением адаптивного иммунного ответа Th2-типа, чему соответствует значительный рост общего пула IgE при среднетяжелом обострении относительно легкого ( $177 \pm 47$  кЕ/л против  $63 \pm 20$ ,  $p < 0,05$ ). Дальнейшее утяжеление процесса характеризовалось активацией системного ответа  $IFN\gamma$  и вторичным ростом индекса  $IFN\gamma/IL-4$  до 12,6.

Сходная закономерность характеризует изменение баланса провоспалительного и противовоспалительного компонентов ответа, оцененного по индексу  $IL-6/IL-10$ . Величина индекса  $IL-6/IL-10$  модулирует от 1,0 при легком обострении до 0,3 при среднетяжелом, восстанавливаясь до 0,9 при тяжелом обострении РРРС. По-видимому, это означает, что обострение средней тяжести ассоциировано с ростом противовоспалительного компонента иммунного ответа в виде системной продукции двух иммуносупрессивных цитокинов —  $IL-10$  и  $IL-4$ .

Частично охарактеризован также интратекальный уровень ряда цитокинов в разные фазы РРРС и при обострении двух степеней тяжести — легкой и среднетяжелой (см. табл. 1). Следует отметить, независимо от фазы и тяжести обострения РС, низкий уровень в ЦСЖ провоспалительных цитокинов  $IL-1\beta$  и  $IL-8$ . Так, содержание  $IL-8$ , при нарастании в циркуляции в прямой корреляции с клинической тяжестью обострения РС, в ЦСЖ у большинства больных при обострении как легкой, так и средней тяжести не достигало порога чувствительности метода (1 пг/мл). Интратекальный уровень  $IL-6$  проявлял склонность к росту только у пациентов с обострением средней тяжести. Одновременно с этим достоверно нарастал и уровень иммуносупрессивного цитокина  $IL-10$  ( $37 \pm 12$  пг/мл против  $3,4 \pm 2,3$  при легком обострении,  $p < 0,05$ ). В сравнении с периодом ремиссии, легкое обострение сопровождалось также 5-кратным ростом в ЦСЖ уровня  $IFN\gamma$  без дальнейшего его нарастания при обострении средней тяжести. Накопление в ЦСЖ цитокина Th2-типа  $IL-4$  было более характерным для обострения средней тяжести, что проявилось в снижении индекса  $IFN\gamma/IL-4$  с 4,8 (при легком обострении) до 1,2 (при среднетяжелом), как это отмечено выше в отношении баланса

цитокинов Th1/Th2 в сыворотке крови. Иными словами, параметры ответа этих цитокинов в ЦСЖ иллюстрируют усиление не только системного, но и локального ответа Th2 в ассоциации с неврологическим дефицитом средней тяжести у детей с обострением РРРС. При этом рост содержания в ЦСЖ  $IL-10$ , как и в сыворотке крови, дополнял противовоспалительный компонент ответа цитокинов.

Источником цитокинов в ЦСЖ при воспалительном процессе в ЦНС может быть как локальный синтез, так и их проникновение в ЦНС из кровеносного русла через гематоэнцефалический барьер. Сопоставление показателей в ЦСЖ с уровнем тех же цитокинов в сыворотке крови показывает, что в периоде ремиссии содержание  $IL-1\beta$  и  $IL-6$  в обеих средах одинаково низкое ( $3,2 \pm 1,1$  и  $8,2 \pm 4,1$  пг/мл —  $IL-1\beta$ ,  $6,5 \pm 2,7$  и  $6,5 \pm 1,3$  пг/мл —  $IL-6$ ). Концентрации в ЦСЖ цитокинов адаптивного ответа Th1 и Th2-типов ( $IFN\gamma$  и  $IL-4$ ) существенно ниже, чем в крови ( $6,5 \pm 4,3$  против  $36 \pm 10$  пг/мл,  $p < 0,05$  и  $1,5 \pm 2,1$  против  $10 \pm 3$  пг/мл,  $p < 0,05$  соответственно). Результаты сопоставления свидетельствуют о том, что у детей в фазе ремиссии РРРС при сниженной или нормальной системной продукции  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IFN\gamma$  и  $IL-4$  локальный ответ провоспалительных цитокинов  $IL-1\beta$  и  $IL-6$ , как и цитокинов адаптивного иммунитета  $IFN\gamma$  и  $IL-4$ , слабо выражен или отсутствует.

У пациентов с обострением РРРС легкой степени тяжести содержание в ЦСЖ цитокинов  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$  и  $IL-10$  было примерно в 10 раз ниже, чем в сыворотке крови (см. табл. 1). Только уровни цитокинов адаптивного иммунитета Th1- и Th2-типов ( $IFN\gamma$  и  $IL-4$ ) оказались сопоставимы в обеих средах. Концентрации  $IFN\gamma$  составляли в ЦСЖ и сыворотке  $33 \pm 6,4$  и  $52 \pm 15$  пг/мл, а  $IL-4$  —  $6,9 \pm 2,7$  и  $5,1 \pm 0,9$  пг/мл, что позволяет предположить локальный синтез этих цитокинов рекрутированными в ЦНС Т-клетками памяти Th1- и Th2-фенотипов. У больных с обострением РРРС средней степени тяжести интратекальные уровни  $IL-1\beta$  и  $IL-8$  оставались низкими, тогда как содержание  $IL-6$  заметно нарастало, почти достигая уровня в крови ( $25 \pm 15$  и  $42 \pm 24$  пг/мл). Одновременно в ликворе существенно возрастал уровень  $IL-10$ , оставаясь все же намного ниже показателя в сыворотке крови ( $37 \pm 12$  против  $137 \pm 24$  пг/мл,  $p < 0,05$ ). Как и при легком обострении, средний уровень в ЦСЖ  $IFN\gamma$  существенно не отличался от показателя в крови ( $29 \pm 9,1$  против  $47 \pm 27$  пг/мл), а уровень  $IL-4$  даже превышал таковой ( $25 \pm 14$  против  $11 \pm 4$  пг/мл). В целом, локальный ответ цитокинов Th1- и Th2-типов в фазе обострения РРРС сочетался с заметным ростом интратекального уровня  $IL-6$  и  $IL-10$  по мере усиления степени неврологического дефицита.

Чрезвычайно важным представляется выяснение патогенетических механизмов прогрессии РС у детей. Обследование небольшой группы ( $n = 5$ ) детей с прогрессирующим течением РС (ПРС) дало нам возможность приблизиться к решению этой задачи, сравнив концентрации цитокинов врожденного и адаптивного иммунитета в крови и ликворе этих больных с показателями у детей с РППС. Концентрации ряда цитокинов в крови и ЦСЖ в периоде ремиссии определены только у двоих пациентов с ПРС, но некоторые характерные моменты побудили нас детально рассмотреть эти данные, не включая их в таблицу 1. В сыворотке крови содержание IL-1 $\beta$  и IL-4 у обоих пациентов было низким, не отличаясь от показателей в фазе ремиссии у больных РППС ( $8 \pm 4$  и  $8,2 \pm 4,1$  пг/мл — IL-1 $\beta$ ;  $14,5 \pm 14$  и  $10 \pm 3$  пг/мл — IL-4). Однако при сравнении концентраций цитокинов в ЦСЖ выявлены различия уровней двух цитокинов: IL-6 и IL-4. Дети с ПРС в фазу ремиссии имели более высокий уровень обоих цитокинов в ликворе, чем дети с РППС (IL-6 —  $20,5 \pm 4,5$  против  $6,5 \pm 2,7$  пг/мл,  $p < 0,05$ ; IL-4 —  $8,5 \pm 1,5$  против  $1,5 \pm 2,1$  пг/мл). По-видимому, это свидетельствует о неполном прекращении воспалительного процесса в ЦНС, с чем согласуются клинические признаки неполной ремиссии у детей с ПРС.

Обострение ПРС у большинства (4 из 5) детей было оценено как тяжелое (у одного — средней тяжести), поэтому мы сравнили системный ответ цитокинов в этой группе больных с показателями при тяжелом обострении у пациентов с РППС (см. табл. 1, группы 5 и 4). Средний уровень в крови IL-1 $\beta$  у пациентов с ПРС оказался несколько ниже, чем в группе сравнения, а содержание IL-6 и IL-10 было одинаково высоким, соответственно тяжести обострения. Концентрации четырех цитокинов — IL-8, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4 — у детей с ПРС значительно превышали их уровни при тяжелом обострении РППС, но достоверным оказался только рост системного ответа IL-8 ( $1539 \pm 278$  против  $804 \pm 55$  пг/мл,  $p < 0,05$ ). Тем не менее, накопление в крови IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  у детей с обострением ПРС (но не РППС) было достоверным относительно нормы, тогда как содержание IL-4 достигало нормы при дефиците этого цитокина у детей с РППС в фазе обострения любой степени тяжести. Гиперпродукция IFN $\gamma$  свидетельствует о том, что обострение у пациентов с ПРС происходит на фоне усиления системного иммунного ответа Th1-типа. Однако у больных с ПРС одновременно нарастает и Th2-ответ, судя по росту продукции IL-4. Итогом является умеренный рост соотношения IFN $\gamma$ /IL-4 в фазе обострения ПРС по сравнению с РППС (19,3 против 12,6).

Содержание цитокинов в ЦСЖ детей с ПРС в фазе обострения удалось сравнить только

с показателями у пациентов с РППС в фазе обострения средней тяжести (см. табл. 1, группы 5 и 3). Средние концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10 в ликворе детей с ПРС обнаруживали тенденцию к росту, в то время как средние уровни IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  — напротив — к снижению относительно значений в группе сравнения, без достоверных различий между группами из-за больших колебаний показателей (особенно у детей с ПРС).

При рассмотрении данных группы больных с ПРС обращает на себя внимание дефицит интратекального уровня IL-6 и IFN $\gamma$  по сравнению с сывороточным. Так, содержание IL-6 в ЦСЖ составляло  $34 \pm 5,5$  пг/мл против  $342 \pm 129$  в сыворотке,  $p < 0,05$ , а IFN $\gamma$  —  $19 \pm 8,9$  пг/мл против  $1100 \pm 544$ ,  $p = 0,05$ . Баланс Th1/Th2 ответов, о котором можно судить по величине индекса IFN $\gamma$ /IL-4, характеризует в фазе обострения ПРС поляризацию системного ответа в сторону Th1, а локального — в сторону Th2 (19,3 и 0,6). Как указано выше, такого резкого расхождения между системным и локальным ответом цитокинов IL-6 и IFN $\gamma$  не было у пациентов с обострением РППС средней степени тяжести. Следовательно, этот феномен может быть связан с наибольшей тяжестью ( $> 6,5$  баллов по шкале EDSS) обострения РС или отражать специфическую особенность локального ответа этих цитокинов у детей с ПРС. Несоответствие между системным и локальным ответом цитокина может быть обусловлено его происхождением из разных клеточных источников. К примеру, Christensen R. et al. (2012) показали, что среди мононуклеаров периферической крови пациентов с РС главными продуцентами IFN $\gamma$  являются натуральные киллеры (NK), тогда как в ЦСЖ — В-клетки, доминирующие среди других клеток ликвора [13].

В целом цитокиновый статус детей с РС имел характерные особенности в зависимости от фазы болезни, клинической тяжести обострения и характера течения процесса. В периоде ремиссии у детей основной группы с РППС сывороточные уровни всех 7 изученных цитокинов не отличались от нормы или даже ее не достигали. Обострение процесса у детей с РППС ассоциировано с накоплением IL-8 и IL-10 в сыворотке крови в прямой корреляции с тяжестью неврологического дефицита. Кроме того, обострение средней тяжести при РППС отличалось от легкого обострения снижением индекса IFN $\gamma$ /IL-4 в крови и ЦСЖ, одновременно с ростом уровня общего IgE. Тяжелое обострение при РППС характеризовалось значительным накоплением в крови IL-6 и вторичным подъемом индекса IFN $\gamma$ /IL-4. Тяжелое обострение болезни у детей с ПРС (по сравнению с РППС) сопровождалось усилением системного



**ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ГЕРПЕСВИРУСОВ В КРОВИ И ЦСЖ В ФАЗАХ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА У ДЕТЕЙ**

Вирусы группы герпес	Ремиссия				Обострение			
	Кровь		ЦСЖ		Кровь		ЦСЖ	
	п	%	п	%	п	%	п	%
EBV	8	29,6	3	17,7	18	66,6*	9	53,1*
HHV-6	7	25,9	2	11,8	16	59,2*	7	41,3*
HSV-1,2	2	7,4	0	0	9	33,3*	3	17,7
CMV	3	11,1	0	0	8	29,0*	2	11,8

Примечание: \* — достоверные различия между ремиссией и обострением,  $p < 0,05$ .

ответа IL-8, а также тенденцией к накоплению в крови IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4. Особенностью детей этой группы явились также низкие уровни в ЦСЖ цитокинов IL-6 и IFN $\gamma$  по сравнению с сывороточными.

### Герпесвирусная инфекция у детей с рассеянным склерозом

Основываясь на гипотезе о значительной роли EBV и других герпесвирусов (ГВ) в патогенезе РС [9, 12, 18, 19], мы обследовали всех пациентов на наличие латентной герпесвирусной инфекции и присутствие свободной ДНК герпесвирусов в сыворотке крови (и ЦСЖ), которое, как считают [7], характеризует продуктивную вирусную инфекцию, так как свободная ДНК не обнаруживается в крови здоровых носителей вируса.

При исследовании специфического анти-телного ответа методом ИФА антитела класса IgG к ядерным антигенам EBV (EBNA) были выявлены в 90% случаев; к HHV-6 — в 87,5%; к вирусу герпеса простого (HSV) — в 77,5% и цитомегаловирусу (CMV) — в 65% случаев. Подобные результаты были получены ранее при обследовании взрослых больных РС, свидетельствуя о ранее перенесенной ГВ-инфекции большинством пациентов [14]. В периоде обострения РС в крови EBV+ пациентов появлялись антитела к капсидному антигену (VCA) EBV класса IgG, иногда IgM (в 20% случаев). Следует подчеркнуть, что 17 из 39 (43,6%) детей перенесли ИМ менее чем за 3 года до начала РС.

Методом ПЦР у большинства больных выявлена ДНК герпесвирусов: у 27 из 39 (69%) в сыворотке крови и у 17 (44%) в ЦСЖ.

Значение ГВ-инфекции в патогенезе РС иллюстрируют результаты тестирования ДНК герпесвирусов в фазе ремиссии и обострения болезни (табл. 2). В большинстве случаев обнаружена ДНК EBV и HHV-6, и частота выявления ДНК этих ГВ в фазе обострения РС по сравнению с фазой ремиссии возрастала более чем вдвое в крови и в 3–4 раза в ЦСЖ.

У абсолютного большинства больных РС с признаками активной ГВ-инфекции обнаружена ДНК EBV — у 25 из 27 (93%) пациентов (табл. 3), при этом преобладало сочетание EBV с другими ГВ (21 из 25, 84%), чаще всего с HHV-6 (17 из 21, 81%). Только у двух подростков микст-герпесвирусная инфекция была представлена сочетанием HHV-6 с другими ГВ.

Сравнение ГВ-инфекции у пациентов основной группы с РРРС и 5 больных с ПРС выявило существенные различия в ее составе. В группе детей с РРРС встречалась моноинфекция EBV (4 случая); преобладала двойная инфекция EBV и HHV-6 (10 детей); у 4 пациентов диагностирована двойная инфекция EBV+HSV-1,2 и только в 4 случаях (18%) обнаружена ДНК одновременно 3–4 ГВ. В то же время у всех 5 детей с ПРС (100 против 18%,  $p < 0,01$ ) выявлена ДНК 3–4 ГВ: у 4 — EBV и HHV-6 с HSV-1,2 и/или CMV, а у одного подростка — HHV-6, HSV-1,2 и CMV.

В целом, значительное накопление ДНК герпесвирусов в крови и ЦСЖ у детей с обострени-

**ТАБЛИЦА 3. ГЕРПЕСВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕ-РЕМИТТИРУЮЩЕМ (РРРС) И ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ (ПРС) ТЕЧЕНИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА У ДЕТЕЙ**

Вирусы группы герпес	РРРС (n = 22)		ПРС (n = 5)		Итого (n = 27)	
	п	%	п	%	п	%
EBV	4	18,2	0	0	4	14,8
EBV+HHV-6	10	45,4	0	0	10	37
EBV+HSV-1,2	4	18,2	0	0	4	14,8
EBV+HHV-6+HSV-1,2	1	4,5	2	40	3	11,1
EBV+HHV-6+CMV	1	4,5	0	0	1	3,7
EBV+HHV-6+HSV-1,2+CMV	1	4,5	2	40	3	11,1
HHV-6+HSV-1,2+CMV	1	4,5	1	20	2	7,4
Итого	22	100	5	100	27	100

ем РС, а также связь прогрессирующего течения РС с обнаружением ДНК одновременно 3–4 ГВ свидетельствуют о том, что ГВ-инфекция играет немаловажную роль в патогенезе РС у детей.

## Обсуждение

Явное доминирование EBV среди ГВ у детей с РС согласуется с множеством фактов, отражающих тесную связь EBV-инфекции с риском развития РС и дальнейшим его течением [9]. В частности, недавно в масштабном исследовании подтверждена связь между перенесенной ранее первичной EBV-инфекцией в виде инфекционного мононуклеоза (ИМ) и развитием РС [16]. Уникальное свойство EBV состоит в способности инфицировать В-клетки, нарушая в них процесс апоптоза и персистируя пожизненно в популяции В-клеток памяти. В В-клетках ДНК вируса изначально замыкается в эписому и в последующем реплицируется в таком виде одновременно с пролиферацией инфицированной клетки (так называемая «латентная репликация» или «активная латенция» [1, 6]). Различают 3 типа активной латенции EBV, при которых экспрессируются разные антигены вируса. В В-клетках памяти поддерживается активная латенция I типа с экспрессией ядерного антигена EBV-1 (EBNA-1), который индуцирует в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах синтез цитокинов Th2-типа и не только не способен вызывать эффективный ответ CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), но и защищает EBV-инфицированные В-клетки от действия ЦТЛ [6]. Для больных РС характерен высокий уровень антител (АТ) к EBNA-1 (в крови и ЦСЖ), рост которого предвещает начало развития болезни [9].

С учетом способности EBV индуцировать Т-клеточный ответ двойной специфичности (к антигенам вируса и ОБМ) [9, 12], кажется закономерным предположение, что основой демиелинизирующего процесса в ЦНС может служить несостоятельность иммунной защиты против EBV, связанная с экспрессией EBNA-1 в фазе латенции, и недостаточностью эффективного Т-клеточного контроля репликации вируса. На первый взгляд, этому предположению противоречат сведения о выраженном EBV-специфическом ответе CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> ЦТЛ у пациентов с РС [9]. Однако Jilek S. et al. (2008) установили, что частота EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, секретирующих IFN $\gamma$ , максимальна при первом эпизоде РС, неуклонно снижаясь в течение 1 года [19]. Кроме того, Jaquier E. et al. (2010), изучая цитокиновый профиль EBV-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток пациентов с РС, обнаружили повышенную экспрессию РНК как IFN $\gamma$ , так и IL-4, что может быть причиной не-

достаточного контроля репликации вируса [18]. В дополнение, Lünemann J. et al. (2008) показали, что EBNA-1-специфические CD4<sup>+</sup> Т-клетки пациентов с РС перекрестно реагируют с антигенами миелина, что предполагает их активное участие в иммунопатологическом процессе [22]. Представляется важным открытие Tzartos J. et al. (2012), установивших, что латентная EBV-инфекция может усиливать воспаление в очагах РС, индуцируя врожденный иммунный ответ, в частности, продукцию IFN $\alpha$  [27].

Pender M., ранее предположивший ключевую роль EBV-инфицированных аутореактивных В-клеток и дефицита CD8<sup>+</sup> ЦТЛ в патогенезе РС (2003, 2009, 2011), рассматривает контроль над EBV-инфекцией (посредством вакцинации, противовирусной терапии или адаптивного переноса аутологичных CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, специфичных к латентным антигенам вируса) как перспективный подход к профилактике и лечению РС [23].

В свете вышесказанного интересно сопоставить выявленные нами особенности ответа цитокинов при РС с данными литературы и собственными данными о системной продукции цитокинов при первичной острой EBV-инфекции (ИМ) у детей. При сравнении уровня цитокинов в крови и ЦСЖ складывается впечатление, что системный ответ цитокинов превалирует и, возможно, предшествует их локальному синтезу в ЦНС. Напрашивается предположение, уже высказанное в литературе в отношении взрослых больных РС [11], что обострению РС у детей предшествует системная активация латентной EBV-инфекции в результате неэффективного ее контроля в фазе ремиссии РС. По-видимому, эту мысль иллюстрирует нормальный или даже сниженный сывороточный уровень цитокинов в фазе ремиссии (см. табл. 1), несмотря на признаки литической репликации EBV у части больных.

По наиболее тесной связи с течением РС у подростков выделяются цитокины IL-8, IL-10, IL-6 и IFN $\gamma$ . Но эти же цитокины, за исключением IL-10, ответ которого при ИМ нами не изучен, играют важную роль в защите от первичной EBV-инфекции. Ранее нами показано, что эффективная элиминация EBV при первичной инфекции зависит от адекватного ответа IL-8 и IFN $\gamma$  наряду с продукцией TNF $\alpha$ . Слабый ответ TNF $\alpha$ , IL-8 и IFN $\gamma$  (при повышенном уровне IL-4) в остром периоде ИМ (а IL-8 и IFN $\gamma$  еще и в периоде ранней реконвалесценции), предвещает развитие рецидивов ИМ в дальнейшем [8]. Еще раньше установлено, что недостаток продукции TNF $\alpha$  при подъеме в крови уровня IL-4 и пула IgE ассоциированы с более тяжелым течением ИМ [2]. Являясь ключевым фактором иммунной защиты против EBV-инфекции, TNF $\alpha$ , по-видимому, играет важную роль в па-

тогенезе РС, так как обнаруживается в крови и ЦСЖ пациентов и способен вызывать *in vitro* эксцитотоксическую гибель нейронов [24].

Переключение профиля системного иммунного ответа с Th1-подобного на Th2-подобный и обратно, установленное по модулям соотношения IFN $\gamma$ /IL-4 при нарастающей тяжести обострения РС, характерно для 4 вариантов иммунной защиты при переключении на более высокий уровень антигенной стимуляции, выделенных нами при ряде острых вирусных и бактериальных инфекций, включая ИМ [3, 4]. В частности, у детей с ИМ, содержание в крови IL-8 постепенно нарастает от 1-го к 4-му уровню иммунной защиты, тогда как IL-6 играет роль, скорее, цитокина Th2-типа, ответ которого модулирует параллельно уровню IL-4 [4]. Тенденция к сближению интратекальных уровней IL-6 и IL-4 прослеживается и при обострении РРРС и ПРС (см. табл. 1, группы 3 и 5), а также в фазе ремиссии у 2 подростков с ПРС.

Низкий интратекальный уровень IL-6 и IFN $\gamma$  (в сравнении с сывороточным) с инверсией индекса IFN $\gamma$ /IL-4 при тяжелом обострении у детей с ПРС отражают, скорее, неэффективный локальный ответ против смеси герпесвирусов, чем усиление аутоиммунного звена патогенеза РС, которое связывают с миелинреактивными CD8<sup>+</sup> ЦТЛ, способными прямо поражать олигодендроциты и продуцирующими IFN $\gamma$  [12]. Как установили Nedegaard S. et al. (2008), специфичные к ОБМ Th2 не способны вызывать аутоиммунный процесс в ЦНС в опытах с переносом и смягчают проявления болезни у пациентов с РС [17].

Отмеченные черты сходства клинического значения ряда цитокинов у детей с РС и ИМ позволяют предположить, что характер ответа цитокинов при обострении РС в большой степени связан с литической реактивацией персистирующей EBV-инфекции.

EBV-инфекция сопровождается потерей защитного потенциала инфицированных клеток и склонностью к суперинфекции другими ГВ, в частности, HHV-6 [1]. Обладая сходством биологических свойств с EBV [12], HHV-6 занимает второе место после EBV по частоте упомина-

ний в связи с РС [21]. Сообщают, к примеру, что реактивация HHV-6 может участвовать в обострении РС, стимулируя продукцию цитокинов Th1-типа [15]. Можно предположить, что синергизм в действии двух этих лимфотропных ГВ усугубляет нарушения в иммунной системе, чем и объясняется повышенная встречаемость сочетаний этих вирусов при хронических лейкоэнцефалитах [10] и РС у детей.

В отношении связи РС с инфекцией HSV-1 и 2 имеются лишь единичные сообщения [28], тогда как CMV-инфекция даже как будто защищает детей [28] и взрослых [25] от развития РС. Тем не менее, одновременное инфицирование 3–4 ГВ, очевидно, вносит свой вклад в течение иммунопатологического процесса, усиливая системный ответ цитокинов IL-8, IFN $\alpha$  и IFN $\gamma$  и провоцируя прогрессию РС у подростков.

## Заключение

Учитывая наибольшую встречаемость EBV у подростков с РС, перенесенный ранее ИМ в значительной части случаев, системную литическую реактивацию EBV в периоде обострения РС у большинства больных и сходные черты ответа цитокинов IL-8, IL-6, IFN $\gamma$  и IL-4 с ответом при остром ИМ, можно заключить, что EBV-инфекция играет базисную роль в создании условий для аутоиммунного процесса в ЦНС у подростков, однако риск развития РС резко нарастает при сочетании EBV с другим лимфотропным вирусом — HHV-6.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность руководителям отдела вирусологических и молекулярно-биологических методов исследования и отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии ФГБУ НИИДИ ФМБА России д.б.н. Е.А. Муриной и д.м.н., проф. С.В. Сидоренко за предоставленные материалы по выявлению герпесвирусной инфекции у пациентов с РС методами серологической диагностики и ПЦР, а также д.б.н. Л.А. Алексеевой за общее руководство работой отдела клинической лабораторной диагностики.

## Список литературы/References

1. Горейко Т.В., Калинина Н.М., Дрыгина Л.Б. Современные представления об иммунопатогенезе инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 2. С. 121–130. [Goreiko T.V., Kalinina N.M., Drygina L.B. The modern conceptions about immunopathogenesis of infection caused by the Epstein–Barr virus. *Infectsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 121–130. doi: 10.15789/2220-7619-2011-2-121-130 (In Russ.)]
2. Железникова Г.Ф., Васякина Л.И., Монахова Н.Е., Павленко М.А., Новожилова Е.В., Попова Н.А., Родионова О.В. Апоптоз и иммунный ответ у детей с острым инфекционным мононуклеозом // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2000. № 4. С. 87–93. [Zheleznikova G.F., Vasjakina L.I., Monachova N.E., Pavlenko M.A., Novozhilova E.V., Popova N.A., Rodionova O.V. Apoptosis and immune response in children with acute infectious mononucleosis. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya = Immunology, Allergology, Infectology*, 2000, no. 4, pp. 87–93. (In Russ.)]

3. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Левина А.С., Монахова Н.Е., Керимова Л.В. Варианты иммунопатогенеза инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна–Барр, у детей // Инфекционные болезни. 2007. Т. 5, № 3. С. 20–27. [Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Levina A.S., Monakhova N.E., Kerimova L.V. Variants of immunopathogenesis of infectious mononucleosis caused by Epstein–Barr virus in children. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2007, vol. 5, no. 3, pp. 20–27. (In Russ.)]
4. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Монахова Н.Е. Варианты иммунопатогенеза острых инфекций у детей. СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2007. 256 с. [Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Monakhova N.E. Varianty immunopatogeneza ostrykh infektsii u detei [Variants of immunopathogenesis of acute infectious diseases in children]. *St. Petersburg: Foliant*, 2007. 256 p.]
5. Иванова Г.П., Скрипченко Н.В., Железникова Г.Ф., Монахова Н.Е. Особенности иммунной защиты при лейкоэнцефалитах у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2012. № 3. С. 56–64. [Ivanova G.P., Skripchenko N.V., Zheleznikova G.F., Monakhova N.E. Specific features of immune protection in children with leukoencephalitis. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Herald of Perinatology and Pediatrics*, 2012, no. 3, pp. 56–64. (In Russ.)]
6. Кудин А.П. Эта «безобидная» вирус Эпштейна–Барр инфекция. Часть 1. Характеристика возбудителя. Реакция иммунной системы на вирус // Медицинские новости. 2006. № 7. С. 14–22. [Kudin A.P. The “harmless” virus Epstein–Barr infection. Part 1. The description of agent. The responses of immune system to virus. *Meditsinskie novosti = Medical News*, 2006, no. 7, pp. 14–22. (In Russ.)]
7. Кудин А.П. Эта «безобидная» вирус Эпштейна–Барр инфекция. Часть 2. Острая ВЭБ-инфекция: эпидемиология, клиника, диагностика, лечение // Медицинские новости. 2006. № 8, Т. 1. С. 25–31. [Kudin A.P. The “harmless” virus Epstein–Barr infection. Part 2. Acute EBV-infection: epidemiology, clinic, diagnostic, treatment. *Meditsinskie novosti = Medical News*, 2006, vol. 8, no. 1, pp. 25–31. (In Russ.)]
8. Левина А.С., Железникова Г.Ф., Бабаченко И.В., Монахова Н.Е., Мурина Е.А. Цитокины в прогнозе рецидивирующего течения инфекционного мононуклеоза у детей // Российский иммунологический журнал. 2009. Т. 3 (12), № 2. С. 184–186. [Levina A.S., Zheleznikova G.F., Babachenko I.V., Monakhova N.E., Murina E.A. Cytokines in the prognosis of recurrent course of infectious mononucleosis in children. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2009, vol. 3 (12), no. 2, pp. 184–186. (In Russ.)]
9. Попова Е.В., Бойко А.Н., Хачанова Н.В., Шаранова С.Н. Вирус Эпштейна–Барр в патогенезе рассеянного склероза (обзор) // Журнал неврологии и психиатрии. 2014. № 2, вып. 2. С. 29–34. [Popova E.V., Boyko A.N., Nachanova N.V., Sharanova S.N. Epstein–Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis (a review). *Zhurnal nevrologii i psikiatrii = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2014, no. 2, Iss. 2, pp. 29–34. (In Russ.)]
10. Скрипченко Н.В., Иванова Г.П., Железникова Г.Ф., Алексеева Л.А., Говорова Л.В. Патогенетические аспекты течения и исходов лейкоэнцефалитов у детей // Нейрохирургия и неврология детского возраста. 2012. № 2–3. С. 58–70. [Skripchenko N.V., Ivanova G.P., Zheleznikova G.F., Alekseeva L.A., Govorova L.V. The pathogenetical aspects of course and outcome of leukoencephalitis in children. *Neirochirurgiya i nevrologiya detskogo vozrasta = Neurosurgery and Pediatric Neurology*, 2012, no. 2–3, pp. 58–70. (In Russ.)]
11. Angelini D., Serafini B., Piras E., Severa M., Coccia E., Rosicarelli B., Ruggieri S., Gasperini C., Buttari F., Centonze D., Mechelli R., Salvetti M., Borsellino G., Aloisi F., Battistini L. Increased CD8+ T cell response to Epstein–Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 4, e1003220. doi: 10.1371/journal.ppat.1003220
12. Cheng W., Ma Y., Gong F., Hu C., Qian L., Huang Q., Yu Q., Zhang J., Chen S., Liu Z., Chen X., Zhou T., Zhang D. Cross-reactivity of autoreactive T cells with MBP and viral antigens in patients with MS. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2012, vol. 17, pp. 1648–1658.
13. Christensen R., Bürnsen L., Hesse D., Krakauer M., Sörensen P., Söndergaard H., Sellebjerg F. Cellular sources of dysregulated cytokines in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation*, 2012, vol. 9, p. 215. doi: 10.1186/1742-2094-9-215
14. Djelilovic-Vranic J., Alajbegovic A. Role of early viral infections in development of multiple sclerosis. *Med. Arch.*, 2012, vol. 66, no. 3, suppl. 1, pp. 37–40.
15. Garcia-Montojo M., De Las Heras V., Dominguez-Mozo M., Bartolome M., Garcia-Martinez M., Arroyo R., Alvarez-Lafuente R. Human herpesvirus 6 and effectiveness of interferon  $\beta$ 1b in multiple sclerosis patients. *Eur. J. Neurol.*, 2011, vol. 18, no. 8, pp. 1027–1035. doi: 10.1111/j.1468-1331.2011.03410.x
16. Gustavsen M., Page C., Moen S., Bjølgerud A., Berg-Hansen P., Nygaard G., Sandvik L., Lie B., Celius E., Harbo H. Environmental exposures and the risk of multiple sclerosis investigated in a Norwegian case-control study. *BMC Neurol.*, 2014, vol. 14 p. 196. doi: 10.1186/s12883-014-0196-x
17. Hedegaard C., Krakauer M., Bendtzen K., Lund H., Sellebjerg F. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*, 2008, vol. 125, no. 2, pp. 161–169. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02837.x
18. Jaquiere E., Jilek S., Schlupe M., Le Goff G., Garcia M., Pantaleo G., Du Pasquier R. Cytokine mRNA profile of Epstein–Barr virus-stimulated highly differentiated T cells in multiple sclerosis: a pilot study. *J. Neuroimmunol.*, 2010, vol. 225, no. 1–2, pp. 167–170. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.04.011
19. Jilek S., Schlupe M., Meylan P., Vingerhoets F., Guignard L., Monney A., Kleeberg J., Le Goff G., Pantaleo G. Strong EBV-specific CD8+ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain*, 2008, vol. 131, pt. 7, pp. 1712–1721. doi: 10.1093/brain/awn108
20. Kallaur A., Oliveira S., Colado Simão A., Delicato de Almeida E., Kaminami Morimoto H., Lopes J., de Carvalho Jennings Pereira W., Marques Andrade R., Muliterno Pelegrino L., Donizete Borelli S., Kaimen-Maciél D., Reiche E. Cytokine profile in relapsing–remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Mol. Med. Rep.*, 2013, vol. 7, no. 3, pp. 1010–1020. doi: 10.1093/brain/awn108
21. Libbey J., Cusick M., Fujinami R. Role of pathogens in multiple sclerosis. *Int. Rev. Immunol.*, 2014, vol. 33, no. 4, pp. 266–283. doi: 10.3109/08830185.2013.823422
22. Lünemann J., Jelčić I., Roberts S., Lutterotti A., Tackenberg B., Martin R., Münz C. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- $\gamma$  and IL-2. *J. Exp. Med.*, 2008, vol. 205, no. 8, pp. 1763–1773. doi: 10.1084/jem.20072397



23. Pender M., Burrows S. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis: potential opportunities for immunotherapy. *Clin. Transl. Immunology*, 2014, vol. 3, no. 10, e27. doi: 10.1038/cti.2014.25
24. Rossi S., Motta C., Studer V., Barbieri F., Buttari F., Bergami A., Sancesario G., Bernardini S., De Angelis G., Martino G., Furlan R., Centonze D. Tumor necrosis factor is elevated in progressive multiple sclerosis and causes excitotoxic neurodegeneration. *Mult. Scler.*, 2014, vol. 20, no. 3, pp. 304–312. doi: 10.1177/1352458513498128
25. Sundqvist E., Bergström T., Daialhosein H., Nyström M., Sundström P., Hillert J., Alfredsson L., Kockum I., Olsson T. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 2014, vol. 20, no. 2, pp. 165–173. doi: 10.1177/1352458513494489
26. Trenova A., Manova M., Kostadinova I., Murdjeva M., Hristova D., Vasileva T., Zahariev Z. Clinical and laboratory study of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with multiple sclerosis. *Folia Med. (Plovdiv)*, 2011, vol. 53, no. 2, pp. 29–35.
27. Tzartos J., Khan G., Vossenkamper A., Cruz-Sadaba M., Lonardi S., Sefia E., Meager A., Elia A., Middeldorp J., Clemens M., Farrell P., Giovannoni G., Meier U. Association of innate immune activation with latent Epstein–Barr virus in active MS lesions. *Neurology*, 2012, vol. 78, no. 1, pp. 15–23. doi: 10.1212/WNL.0b013e31823ed057
28. Waubant E., Mowry E., Krupp L., Chitnis T., Yeh E., Kuntz N., Ness J., Chabas D., Strober J., McDonald J., Belman A., Milazzo M., Gorman M., Weinstock-Guttman B., Rodriguez M., Oksenberg J., James J. Common viruses associated with lower pediatric multiple sclerosis risk. *Neurology*, 2011, vol. 76, no. 23, pp. 1989–1995. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821e552a

**Авторы:**

**Железникова Г.Ф.**, д.м.н., профессор, старший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Скрипченко Н.В.**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Иванова Г.П.**, д.м.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отдела интенсивной терапии неотложных состояний ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Суровцева А.В.**, очный аспирант отдела нейроинфекций и органической патологии нервной системы ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Монахова Н.Е.**, научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики ФГБУ НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Zheleznikova G.F.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostic, Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

**Skripchenko N.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director on Science, Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

**Ivanova G.P.**, PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Head of the Department of Intensive Therapy in Urgent Cases, Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

**Surovtseva A.V.**, PhD Candidate, Department of Neuroinfections and Organic Pathology of Nervous System, Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation;

**Monakhova N.E.**, Senior Researcher, Department of Clinical Laboratory Diagnostic, Institute of Children's Infections, St. Petersburg, Russian Federation.

# МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)

А.В. Семенов<sup>1,2,3</sup>, Ю.В. Останкова<sup>1</sup>, В.В. Герасимова<sup>4</sup>, М.А. Бичурина<sup>1</sup>,  
А.В. Козлов<sup>3</sup>, С.Л. Мукомолов<sup>1</sup>, Арег А. Тотолян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Количество инфицированных вирусом гепатита С в мире составляет почти 3% от населения земного шара, при этом хронический гепатит С развивается приблизительно у 70–80% инфицированных. Хронический гепатит С является ведущей причиной цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, таким образом становясь одной из глобальных проблем общественного здравоохранения. Клинические проявления разнообразны, и зависят в основном от биологических свойств вируса и его взаимодействия с иммунной системой хозяина. Генотип вируса гепатита С является важным фактором, определяющим как вирусный ответ на противовирусную терапию, так и риск развития тяжелого заболевания печени. Определение генотипов и субтипов вируса важно для лучшего понимания эпидемиологических и вирусологических особенностей заболевания. Распространенность генотипов вируса гепатита С варьируется в разных географических регионах. Данные о распределении генотипов ВГС для некоторых субъектов Российской Федерации весьма ограничены, особенно это касается сельских регионов, Северной Сибири, Дальнего Востока, полярных регионов. Молекулярные характеристики циркулирующих на данных территориях вирусов практически не представлены в литературе. Одним из таких регионов является Якутия. В настоящем исследовании методом прямого секвенирования NS5B области РНК ВГС определены генетические варианты ВГС у жителей Якутии, страдающих ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой. На основании филогенетического анализа показано, что среди обследованных больных ХВГС при умеренной и высокой вирусной нагрузке ВГС преобладает генотип 1 (88,3%) по сравнению с генотипом 2 (6,7%) и 3 (3,2%). Полученные результаты о распространенности субтипа 1b согласуются с данными о связи этого субтипа с высоким уровнем виремии, большей длительностью и тяжестью течения заболевания печени, а также преимущественным развитием ХВГС у пациентов с субтипом 1b, по сравнению с лицами, инфицированными иными субтипами вируса гепатита С. Для некоторых изолятов вируса гепатита С из Якутии показано сходство нуклеотидной после-

---

**Адрес для переписки:**

Останкова Юлия Владимировна  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.  
Тел.: 8 (812) 233-20-92 (служебн).  
E-mail: shenna1@yandex.ru

**Contacts:**

Julia V. Ostankova  
194223, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 (812) 233-20-92 (office).  
E-mail: shenna1@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Семенов А.В., Останкова Ю.В., Герасимова В.В., Бичурина М.А.,  
Козлов А.В., Мукомолов С.Л., Тотолян А.А. Молекулярно-  
эпидемиологические особенности изолятов вируса гепатита С  
из разных регионов Республики Саха (Якутия) //  
Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 359–372.  
doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-359-372

**Citation:**

Semenov A.V., Ostankova Ju.V., Gerasimova V.V., Bichurina M.A.,  
Kozlov A.V., Mukomolov S.L., Totolian A.A. Molecular epidemiological  
features of hepatitis C virus isolates from different regions  
of the Republic of Sakha (Yakutia) // Russian Journal of Infection  
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4,  
pp. 359–372. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-359-372

довательности региона NS5B с соответствующими фрагментами изолятов из США, Бразилии и Ирландии. Обсуждается тесная связь выявленных в нашей работе изолятов вирусного гепатита С субтипа 2a с изолятами, найденными в Китае. Впервые на территории РФ выявлен вирусный гепатит С субтипа 3g, предположительно завезенный из стран Южной Азии. Комплексное использование молекулярных, вирусологических, демографических и эпидемиологических методов и информации для наблюдения за инфекциями будет способствовать пониманию текущей эпидемиологической ситуации по вирусному гепатиту С в России. Масштабное исследование генотипов ВГС в Российской Федерации позволит оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса.

**Ключевые слова:** гепатит С, генотипирование, секвенирование, генотип, субтип, молекулярная эпидемиология, филогения, Республика Саха (Якутия).

## MOLECULAR EPIDEMIOLOGY FEATURES OF HEPATITIS C VIRUS ISOLATES FROM DIFFERENT REGIONS OF THE REPUBLIC SAKHA (YAKUTIA)

Semenov A.V.<sup>a,b,c</sup>, Ostankova Ju.V.<sup>a</sup>, Gerasimova V.V.<sup>d</sup>, Bichurina M.A.<sup>a</sup>, Kozlov A.V.<sup>c</sup>, Mukomolov S.L.<sup>a</sup>, Totolian Areg A.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

<sup>c</sup> North-West State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

<sup>d</sup> North-East Federal University n.a. M.K. Ammosov, Yakutsk, Russia

**Abstract.** According to WHO data about 3% of population are infected by hepatitis C virus (HCV) worldwide. Chronic hepatitis C is the leading cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma, thus it becoming one of the global public health problems. Clinical manifestations are varied and depend mainly of the virus biological properties and its interaction with the host immune system. Determination of virus genotype and subtype is important for a better understanding of the epidemiological and virological features of the disease. The prevalence genotypes hepatitis C virus is varies in different geographical regions of the world. The data about HCV genotypes distribution in some Russian Federation regions are very limited, especially about HCV genotypes prevalence in Siberia, Far East and some rural regions. One of such regions is Yakutia. In our study we identified genetic variants of HCV in chronic hepatitis C patients with moderate and high viral load from Yakutia by direct sequencing of HCV RNA NS5B region. Based on phylogenetic analysis we found the prevalent genotype 1 (88.3%), than genotype 2 (6.7%) and 3 (3.2%) among HCV patients with moderate and high viral load. Our results on the prevalence of subtype 1b are consistent with the data on the connection between this subtype with high levels of viremia, greater duration and severity of liver disease, as well as the development of chronic hepatitis C in patients infected by HCV subtype 1b, compared with those infected with other subtypes of hepatitis virus C. The similarity of some Yakutian isolates with isolates from the United States, Brazil and Ireland was found. We discuss HCV subtype 2a isolates identified origin from isolates found in China. First in the territory of the Russian Federation HCV subtype 3g was identified, presumably imported from South Asia. Interconnected use of molecular, virological, demographic and epidemiological methods and information to monitor the infections will contribute to the understanding of the current HCV epidemiology in Russia.

**Key words:** hepatitis C, genotyping, sequencing, genotype, subtype, molecular epidemiology, phylogeny, Republic Sakha (Yakutia).

## Введение

Количество инфицированных вирусом гепатита С (ВГС) в мире составляет почти 3% от населения земного шара [29]. Различные регионы мира классифицируют как регионы с «высокой» (> 3,5%), «умеренной» (1,5–3,5%) и «низкой» (< 1,5%) распространенностью вируса. Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) развивается приблизительно у 70–80% инфицированных. Во всем мире ХВГС является ведущей причиной цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы с летальным исходом и одной из глобальных проблем общественного здравоохранения. Согласно прогнозу, в ближайшее десятилетие ожидается значительное увеличе-

ние числа лиц с хронической инфекцией и, соответственно, повышение смертности, связанной с различными осложнениями ХВГС, в том числе фиброза/цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [14, 36].

Клинические проявления ХВГС разнообразны и зависят в основном от биологических свойств вируса и от его взаимодействия с иммунной системой хозяина [15, 22]. Для ВГС показано существенное разнообразие нуклеотидной последовательности по всему вирусному геному. Одной из самых интересных особенностей ВГС является высокая генетическая неоднородность вирусной популяции. Многие варианты ВГС показывают только 68–79% гомологии. На основании кластеризации

гомологичных последовательностей описаны разные генотипы и подтипы ВГС, встречающиеся в тех или иных географических регионах [48].

На данный момент идентифицированные изоляты ВГС принято подразделять на 7 генотипов [50], отличающихся друг от друга по составу нуклеотидных последовательностей на 31–33%, и, по меньшей мере, на 67 подтвержденных субтипов; 20 субтипов временно отнесенных к одному из генотипов и 21 не отнесенных к какому-либо генотипу, отличающихся друг от друга по составу нуклеотидных последовательностей на 20–25% [27]. Генотип ВГС является важным фактором, определяющим как вирусный ответ на противовирусную терапию, так и риск развития тяжелого заболевания печени. Так, например, ВГС 2 и 3 генотипов более чувствителен к терапии пегилированным интерфероном, тогда как для пациентов, инфицированных ВГС генотипа 1, терапия интерфероном менее предпочтительна. ВГС существует в виде сложной смеси тесно связанных, но генетически различных вариантов. Такая стратегия позволяет вирусу эффективно уклоняться от иммунного ответа хозяина [18]. Другим фактором, значимым для вирусного ответа на терапию и влияющим на длительность лечения, является вирусная нагрузка [19]. Показано, что высокая вирусная нагрузка ассоциирована с низкой частотой устойчивого вирусологического ответа на стандартную терапию ПЭГ-интерфероном и, по сравнению с низким уровнем виремии, допускает более высокую вероятность рецидива [49]. У пациентов, инфицированных генотипом 1, высокая вирусная нагрузка встречается чаще, чем у пациентов с генотипами 2 или 3 [38]. Тем не менее, корреляция между генотипами и вирусной нагрузкой остается спорной [16]. Определение генотипов и субтипов ВГС важно для лучшего понимания эпидемиологических и вирусологических особенностей заболевания, а также предоставляет дополнительную информацию для принятия решения о выборе тактики противовирусной терапии.

Распространенность генотипов ВГС варьирует в разных географических регионах. Генотипы 1, 2 и 3 широко распространены в мире, тогда как другие ограничиваются определенными географическими областями [47]. Например, субтипы 1a, 1b, 2a, 2b, 3a составляют более чем 90% всех инфекций ВГС в России, Европе, Китае, Японии, Австралии [25]. Генотип 4 субтип 4a выявлен преимущественно у больных ХВГС в Египте, Северной Африке и Сахаре, а также на Ближнем Востоке [6]. Однако субтипы 1a, 1b, 2a, 3a также присутствуют в данных

популяциях [20]. Генотипы 5 и 6 обнаружены в Южной Африке и Гонконге, а также в Китае, Юго-Восточной Азии, Таиланде и Вьетнаме. Недавно в Демократической Республике Конго выявлен абсолютно новый генотип 7 [35]. Генотипы подразделяются на множество субтипов, число которых в разных генотипах варьируется. Распространенность разных субтипов в регионах мира постоянно меняется.

Генотип 1 состоит из 7 субтипов (1a–1i). В то время как субтипы 1a и 1b распространены повсеместно, субтипы 1c–1i выявлены преимущественно в Индонезии, Камеруне и т.д., но значительно реже встречаются в Европе [10].

Генотип 2, широко распространенный по всему миру, состоит из 11 субтипов (2a–2г), сравнительно редких для Западной Европы и Северной Америки, но преобладающих в Восточной Азии [56]. Большинство редких субтипов генотипа 2 имеют ограниченный ареал и, как правило, выделены от пациентов африканского или азиатского происхождения [31].

Генотип 3 подразделяют на 6 субтипов (3a–3k). При этом субтипы 3a и 3b распространены по всему миру в основном за счет передачи при внутривенном употреблении наркотиков, а также из-за иммиграции инфицированных людей в Европу и Северную Америку. Специфичные субтипы генотипа 3 были найдены в некоторых регионах Азии и Индии, что подтверждает гипотезу эндемичной циркуляции вируса [37]. Изоляты с редкими субтипами генотипа 3 были описаны в Индии, Бангладеш, Вьетнаме и Индонезии. Различные субтипы генотипа 3 остаются основной причиной инфекции ВГС в Индии. На основании филогенетического анализа редких неклассифицированных изолятов ВГС из Индии был введен новый субтип 3, обозначенный как 3g [42].

Генотипы 4 и 6 состоят из 17 и 24 редко встречающихся субтипов соответственно. Большинство из них преобладают на Ближнем Востоке, в некоторых регионах Африки, встречаются в странах Юго-Восточной Азии [21, 33].

Генотип 5 включает в себя только один субтип 5a. В южной части Африки на субтип 5a приходится более 50% всех инфекций ВГС [12].

Генотип 7 представлен одним субтипом 7a, недавно выявленным в Центральной Африке [36].

Несмотря на ограниченный ареал распространенности большинства редких субтипов, последние данные свидетельствуют об увеличении их спорадического присутствия в разных странах Европы; особенно на Юге Европы (в Италии, Греции, Испании) [30].

Известно, что на большинстве территорий бывшего СССР преобладает ВГС субтипа 1b, далее следуют 3a, 2a, 1a субтипы. При этом не показано существенных различий в распре-



делении генотипов для разных стран бывшего СССР среди ВГС-инфицированных доноров крови и больных ХВГС [55].

В Закавказском регионе наиболее высокий показатель распространенности ВГС отмечен для Грузии (6,7%) [45]. Анализ генотипов показал преобладание на территории Грузии генотипа 1 (42,0%) по сравнению с генотипами 3 (32,9%) и 2 (24,9%). У нескольких пациентов (0,1%) был выявлен генотип 4 [24]. ВГС генотипа 1 субтипа 1b также преобладает в Узбекистане (64,2%), субтип 3a встречается в Узбекистане с частотой 25,0%, субтипы 2a, 1a, 2b и 3b были выявлены в 3,8; 2,9; 2,9 и 1,0% случаев соответственно [28]. Несмотря на географическую удаленность, сходное распределение генотипов выявлено и в странах прибалтийского региона. Так, в Эстонии субтип 1b составляет 71%, субтип 3a — 24%, 2c — 2%, 1a — 1% и 2a — 1% [52]. В Латвии 77% ВГС изолятов принадлежали к субтипу 1b, 17% — к 3a и 6% составил субтип 2c [51]. Анализ распространенности ВГС в Литве демонстрирует несколько меньшее преобладание субтипа 1b (54,3%) по сравнению с субтипами 3a (23,9%), 2a (10,9%), 2b (4,3%) и инфицированием двумя субтипами одновременно (6,5%) [7].

Относительная распространенность генотипов ВГС в Белоруссии в целом соответствует ситуации в России: представлены субтипы 1b (53,8%), 3a (38,5%), 1a (5,1%); однако появление не характерных для РФ субтипов отражает более тесную связь с общеевропейскими миграционными процессами — 4a (1,3%) и 4d (1,3%) [40]. Известно, что субтипы 4, 5 и 6 ВГС занесены в европейскую популяцию инфицированными мигрантами из Южной и Юго-Восточной Азии, Ближнего Востока и Африки [17].

Интересно, что высокая распространенность ВГС была выявлена среди иммигрантов из бывшего СССР в Нью-Йорке. Распространенность гепатита С составила 11,1% для выходцев из России, 29,0% из Узбекистана, 31,0% с Украины, 36,8% из других регионов [8, 44].

В разных регионах Российской Федерации, несмотря на большие географические расстояния, показано сходное распределение генотипов ВГС 1b и 3a, и в целом оно соответствует средним показателям по России: субтип 1b составляет 52,1%, субтип 3a — 37,2% и около 2% случаев — иные субтипы HCV [3]. Тем не менее, распространенность генотипа 2a может значительно варьироваться в разных городах: от отсутствия этого генотипа в Санкт-Петербурге и Новосибирске до 3,7% в Барнауле, 4,3% в Краснодаре и 23,0% в Хабаровске [34]. В Западной Сибири субтипы 1b и 3a преобладают (50,3 и 44,8% соответственно), далее 2a (4,4%) и 2c (0,3%) [46]. Некоторый сдвиг распределе-

ния генотипов в сторону преобладания субтипа 3a (56,9%) по сравнению с 1b (29,2%) и 1a (11,9%) показан среди наркоманов и пациентов инфекционных стационаров в Санкт-Петербурге [41].

Необходимо отметить, что данные о распределении генотипов ВГС для некоторых субъектов Российской Федерации весьма ограничены, особенно это касается сельских регионов, Северной Сибири, Дальнего Востока, полярных регионов. Одним из таких регионов является Якутия. Это чрезвычайно обширная территория площадью 3 103,2 тыс. кв. километров. В то же время население республики в соответствии с данными Госкомстата РФ составляет всего 956 896 человек (плотность населения — 0,31 человек/км<sup>2</sup>), из которых 65,28% проживают в городах. В центральной части Якутии проживает около 500 000 человек (Якутск, Мегино-Кангаласский, Амгинский, Чурапчинский, Усть-Алданский, Мирнинский, Хангаласский улусы). Якутия является регионом с высокой распространенностью гепатита С. Заболеваемость хроническим гепатитом С в Якутии почти в два раза выше, чем в целом по России (по данным на 2013 г. — 43,2 на 100 000) [2, 43].

Предыдущие исследования показали, что большинство пациентов, инфицированных ВГС в Якутии, заражены генотипом 1 субтипом 1b (68,8–76,4%) и, в несколько меньшей степени, — субтипом 3a генотипа 3 (13,4–18,8%) [3]. Однако исследования были проведены с использованием методов серотипирования или с применением коммерческого набора ПЦР, предназначенного для выявления ограниченного диапазона генотипов (в основном 1a, 1b, 2, 3a субтипы). Вследствие этого до 19,8% ВГС-положительных образцов остались неопознанными.

В настоящее время для генотипирования ВГС используются различные методики: серотипирование ВГС, типоспецифическая ПЦР, гибридизация продуктов амплификации с адсорбированными геноспецифическими зондами (INNO-LiPA), ПДРФ-генотипирование и др. Но эталонным методом генотипирования ВГС является непосредственное определение первичной структуры РНК ВГС методом прямого секвенирования и последующий филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей, который позволяет четко охарактеризовать вирусный изолят [39].

Прямое секвенирование NS5B области ВГС зарекомендовало себя как надежный способ для идентификации различных генотипов ВГС и считается методом выбора для характеристики вирусных изолятов во всем мире. Анализ последовательности NS5B для генотипирования

ВГС обеспечивает точную идентификацию генотипа и эпидемиологическую картину циркулирующих штаммов вируса [57].

В настоящем исследовании мы применили генотипирование на основе прямого секвенирования NS5B области РНК ВГС для оценки распространенности генетических вариантов ВГС у жителей Якутии, страдающих ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой (более 100 000 МЕ/мл).

Задачей данного исследования была оценка распределения субтипов ВГС среди пациентов с высокой вирусной нагрузкой из разных регионов Республики Саха (Якутия).

## Материалы и методы

Исследование было одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Материалом исследования служила плазма крови 60 пациентов с ХВГС из разных регионов Республики Саха (Якутия). Все пациенты удовлетворяли следующим критериям: положительные anti-HCV IgG; РНК ВГС положительная на протяжении по крайней мере

6 месяцев, умеренная или высокая вирусная нагрузка (более 100 000 МЕ/мл); отсутствие ВИЧ и/или HBV-коинфекции; возраст при регистрации ХВГС старше 18 лет. Исследуемая группа включала 25 мужчин и 35 женщин в возрасте от 18 до 60 лет. Представлены национальности: 32 саха, 3 эвенка, 1 бурят, 18 русских, 4 украинца, 1 молдаванин и 1 белорус.

Образцы были получены из 16 различных городов и сельских районов республики (Нюрбинский, Томпонский, Амгинский, Верхоянский, Кангаласский, Ленский, Сунтарский, Хангаласский, Чурапчинский, Вилюйский, Таттинский, Алданский районы; г. Якутск, г. Жатай, г. Мирный, г. Нерюнгри) (рис. 1).

Выделение РНК ВГС из образцов плазмы крови пациентов и обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с использованием коммерческих наборов «АмплиПрайм Рибопреп» и «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Для ПЦР использовали перекрывающиеся пары праймеров, фланкирующих фрагмент NS5B региона протяженностью 383 нуклеотида (нт), с 8256 нт по 8638 нт, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту H77 (AF009606) [26].

Состав амплификационной смеси: 15 пмоль/л каждого олигопраймера, 1,0 ммоль/л каждого ну-

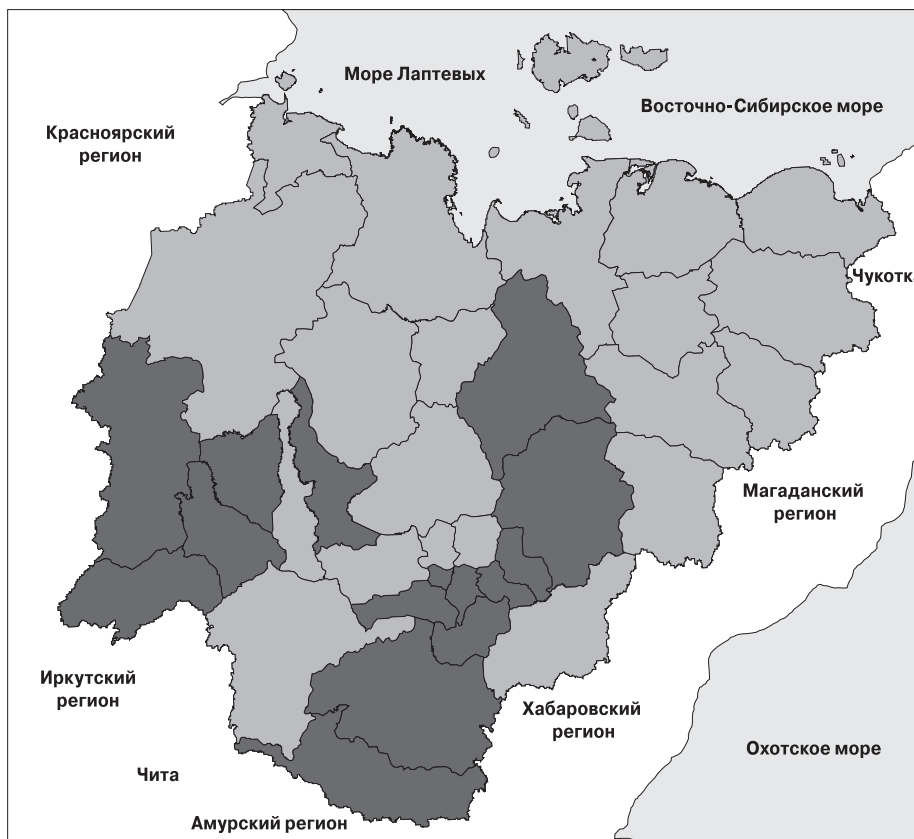


Рисунок 1. Районы сбора биологического материала на территории Якутии (отмечены темно-серым)

клеозидтрифосфата, 6,7 ммоль/л  $MgCl_2$ , 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 ммоль/л Трис-НСl, (рН 8,8), 200 ммоль/л  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,1% (v/v) твин 20), DMSO 10% от конечного объема, 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 25 мкл. ПЦР проводили при следующих условиях: после денатурации при 95°C в течение 5 мин устанавливали 35 циклов амплификации в режиме: 95°C — 20 с, 58°C — 20 с, 72°C — 90 с; затем финальная элонгация при 72°C — 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1 × TBE), окрашенном бромистым этидием.

Продукты первичной амплификации и секвенирующей реакции очищали по методике, рекомендованной для Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen, Германия). Для анализа качества очищения осадок растворяли в 30 мкл TE-буфера и визуализировали в агарозном геле. Концентрацию НК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 по стандартной методике, рекомендованной производителем. Очищенный фрагмент с концентрацией 50–100 нг использовали для постановки секвенирующих реакций с прямого и обратного праймеров с использованием набора Genome Lab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter Inc., США). Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок растворяли в SLS-буфере и помещали в генетический анализатор GenomeLab GeXP (Beckman Coulter Inc., США).

Первичный анализ полученного фрагмента проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA версия 5, используя алгоритм ClustalW [23]. Для построения филогенетических деревьев использовали метод UPGMA, bootstrap N = 500 [53].

## Результаты и обсуждение

Для всех 60 образцов была получена нуклеотидная последовательность NS5B региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа.

Генотип и субтип были определены для всех образцов. На основании филогенетического анализа 60-ти изолятов показано, что среди обследованных больных ХВГС при умеренной и высокой вирусной нагрузке ВГС преобладает генотип 1 (88,3%) по сравнению с генотипом 2 (6,7%) и 3 (3,2%). При этом наиболее распространенным субтипом является субтип 1b (87,7%). Остальные субтипы найдены в единичных случаях: 1a — 1,6%, 2a — 6,7%, 3a — 1,6%, 3g — 1,6%.

Распределение генотипов ВГС в географических регионах Республики Саха (Якутия) представлено на рисунке 2.

В целом показанное нами распределение субтипов 1b, 1a, 2a соответствует ранее опубликованным данным, однако встречаемость субтипа 3a у больных ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой значительно меньше, чем в популяции в целом [5]. Особый интерес представляет ВГС субтип 3g, впервые выявленный на территории РФ.

Установлено, что половая принадлежность и национальность не являются значимыми факторами для распределения генотипов ВГС в Якутии, что согласуется с результатами других исследований.

Несмотря на широкий временной спектр даты постановки диагноза ХВГС (ранние изоляты были идентифицированы как ВГС-положительные в 1992–1995 гг., последние изоляты — в 2011–2012 гг.), мы обнаружили низкую степень гетерогенности проанализированных штаммов ВГС. Филогенетический анализ показал, что некоторые из представленных штаммов ВГС циркулируют в различных районах Якутии на протяжении нескольких десятилетий. В то же время показаны кластеры изолятов ВГС субтипа 1b, отличающиеся от изолятов вышеупомянутого эпидемиологического спектра.

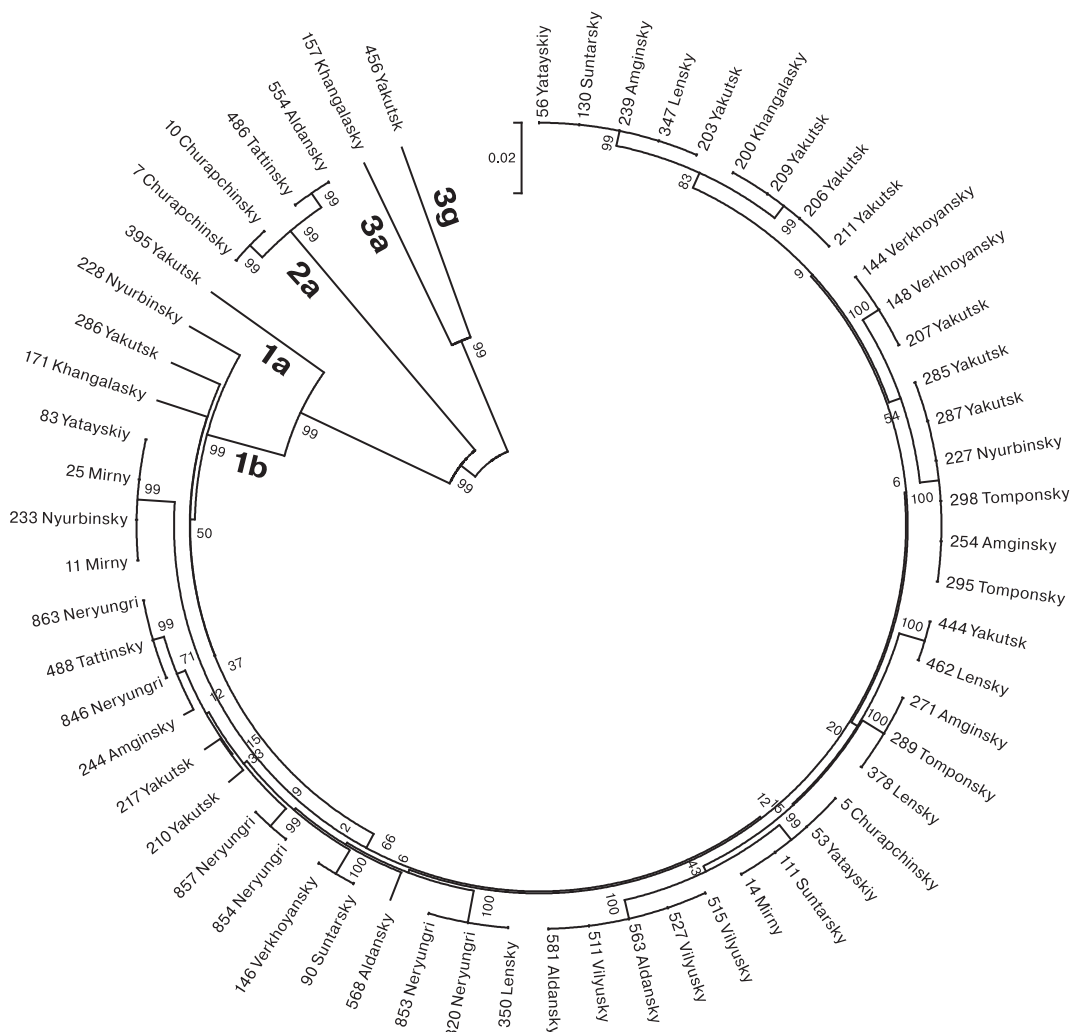
Для группы пациентов старше 40 лет (22 человека) показано наличие только 1b субтипа ВГС. Примечательно, что в Западной Сибири генотип 1 также преобладал в старшей возрастной группе — 75% среди пациентов 51–60 лет [47], в то время как для Уральского региона показано преобладание субтипа 1b среди лиц в возрасте от 15 до 27 лет. Преобладание субтипа 1b у больных ХВГС согласуется с результатами работ иностранных исследователей, показавших, что субтип 1b в основном распространяется через инвазивные медицинские манипуляции, трансфузиологические процедуры и другие внутрибольничные пути передачи [54]. Следует отметить, что в нашем исследовании были представлены только пациенты с умеренной и высокой вирусной нагрузкой. Полученные нами результаты о распространенности субтипа 1b согласуются с данными о связи высокого уровня виремии, большей длительности и тяжести течения заболевания печени у пациентов с наличием субтипа 1b, а также преимущественном развитии ХВГС у больных с этим субтипом ВГС [9].

При анализе последовательностей группы изолятов субтипа 1b процент идентичности нуклеотидов составил  $96,03 \pm 0,45\%$ . При сравнении фрагментов с представленными в GenBank последовательностями было показано очень близкое сходство (до 100% идентичности) некоторых штаммов из Якутии со штаммами

из США, Бразилии и Ирландии (см. рис. 3). Очевидно, что причиной этого может являться сходная направленность мутаций в гипервариабельной области NS5B.

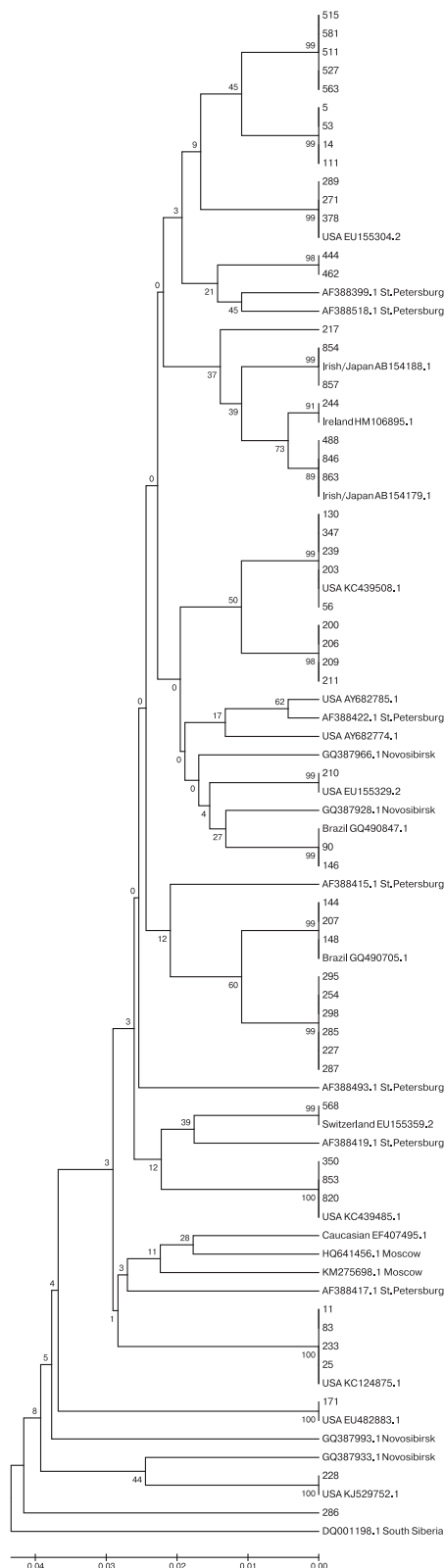
Как известно, ВГС относится к вирусам с высокой частотой мутаций. Эти мутации направлены прежде всего на ускользание вируса от иммунного ответа организма хозяина или действия противовирусных лекарственных средств. Таким образом, «окружающая среда» вирусов в разных регионах мира во многом оказывается схожей; в особенности это касается возбудителей инфекции, для которых повсеместно применяются стандартизированные схемы противовирусной терапии. Микроэволюция вируса приводит к выявлению в разных странах крайне близких по нуклеотидному составу, особенно в гипервариабельных областях, изолятов, которые в действительности не имеют «родственных» связей. Филогенетический анализ при этом указывает на сходство эволюционных линий в разных регионах [55].

Относительно высокое сходство изученных нами изолятов с изолятами из США, а не России, обусловлено, скорее всего, не происхождением штаммов из США, Ирландии или Японии, а низким уровнем представленности в международной базе данных Genbank штаммов, изолированных на территории РФ. Так, например, в международной базе данных Genbank, по состоянию на сентябрь 2015 г., депонированы более 50 000 последовательностей (или фрагментов последовательностей) вируса гепатита С из США, 1847 последовательностей из Швеции, в то время как со всей России, несмотря на обширность территорий и количество проживающих, представлена только 931 последовательность ВГС, что сопоставимо с объемом описанных изолятов из Бельгии ( $n = 720$ ). Данное обстоятельство становится серьезной проблемой для оценки распространенности генотипов гепатита С и анализа эпидемиологической ситуации в России, странах бывшего Советского Союза и географически близких регионах.



**Рисунок 2.** Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГС, выделенных от пациентов с ХВГС из разных регионов Республики Саха (Якутия)





**Рисунок 3. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГС субтипа 1b, выделенных от пациентов с ХВГС из разных регионов Якутии, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из других регионов России и зарубежных стран**

Тесная связь распространенности тех или иных генотипов в различных группах (включая группы высокого риска) с выявленными путями передачи, а не с географической близостью показал Linqi Zhang и др. [32].

Особый интерес для эпидемиологов представляют случаи семейного гепатита С. Высокая степень сходства генома вируса поддерживает гипотезу о возможной передаче ВГС внутри семейного очага, в том числе через совместное использование предметов личной гигиены [11]. В исследовании принимала участие супружеская пара в возрасте старше 50 лет, проживающая в г. Якутске. Оба пациента с ХВГС и высокой вирусной нагрузкой инфицированы ВГС субтипа 1b. Однако эти штаммы существенно отличаются друг от друга: процент идентичности нуклеотидной последовательности составил всего 92% (рис. 4).

Низкий процент сходства нуклеотидной последовательности позволяет предположить, что партнеры были инфицированы разными изолятами вируса из разных источников. Заражение партнеров разными штаммами — случай редкий, требующий дальнейшего более глубокого изучения, однако не исключительный. Известны, например, две семейные пары, у которых процент идентичности нуклеотидной последовательности составлял 70,1% (генотипы 2b/1b) и 82,2% (1b/1a) соответственно [12].

В нашем исследовании субтип 2a ВГС составил 6,7%. Мы выявили две группы пациентов с генотипом 2a. Процент нуклеотидной идентичности между группами составил  $98 \pm 0,27\%$ , что, несмотря на территориальное деление, позволяет предположить общий источник инфекции. Субтип 2a ВГС не характерен для Якутии, и определение потенциального источника его происхождения представляется значимым для выявления путей распространения вируса. На рис. 5 показано сравнение NS5B области изолятов, выделенных от пациентов из Якутии, с представленными в международной базе данных GenBank последовательностями из других областей РФ и с наиболее сходными последовательностями из других стран. Очевидна тесная связь изолятов из Якутии с изолятами ВГС субтипа 2a, найденными в Китае. Учитывая обширные торгово-экономические отношения Якутии со странами Восточной Азии, нельзя исключить сравнительно недавний завоз этих изолятов.

Наиболее редким в нашем исследовании оказался ВГС генотип 3 (3,2%).

Ранее для Якутии была показана высокая распространенность ВГС генотипа 3 субтипа 3a. Так, например, в 2000 г. частота встречаемости ВГС субтипа 3a составила 16%, а среди лиц, употребляющих наркотики, субтип 3a яв-

Query 286f	1	TATGACACCCGCTGCTTTGACTCAACGGTCACAGAGAGTGACATCCGTGTTGAGGAGTCA	60
Query 287m	1	.....T.....T.....C.....C.....	60
Query 286f	61	ATTTACCAATGTTGTGACCTGGCCCCGAAGCCAGACAGGCCATAAGGTCGCTCACAGAG	120
Query 287m	61	.....T.....A.....G...	120
Query 286f	121	CGGCTCTATATCGGGGGTCTTTGACTAATTCAAAGGGCAGAACTGCGGTTATCGCCGA	180
Query 287m	121	.....T..C..T.....C..CC.....G	180
Query 286f	181	TGCCGCGCGAGCGGCTGTGACGACCAGCTGCGGTAATACCCCTCACATGTTACTTGAAG	240
Query 287m	181	.....T.....T.....	240
Query 286f	241	GCCTCTGCAGCCTGTTCGAGCTGCGGAGCTCGAGGACTACACGATGCTCGTGGACGGCGAC	300
Query 287m	241	.....G.....AA.....C.....G.....TG...A...	300
Query 286f	301	GACCTAGTCGTTATCTGCGAAAGCGCGGGAACCCAAGAGGATGCGGCGAACCTACGAGTC	360
Query 287m	301	.....T.....T.....G.....C.....A.G.....	360
Query 286f	361	TTCACGGAGGCTATGACTAGGTA	383
Query 287m	361	.....	383

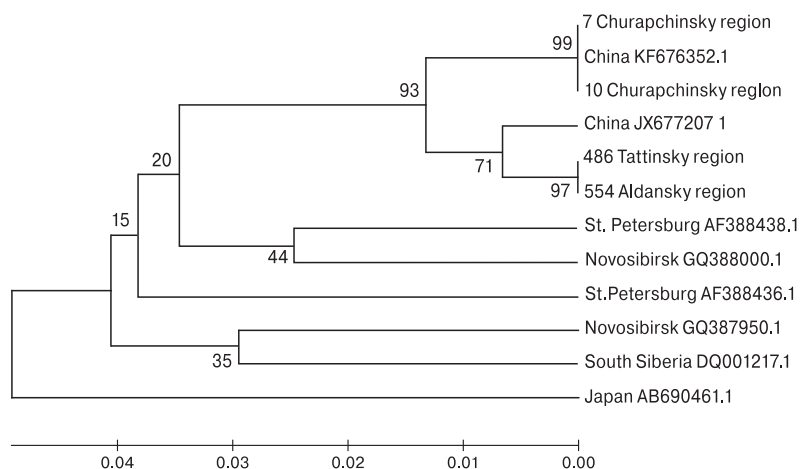
**Рисунок 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей NS5B области ВГС изолятов, выделенных от супружеской пары (жена — образец № 286, муж — образец № 287)**

лялся преобладающим [1]. Некоторые штаммы генотипа 3 (субтипы 3a и 3b) распространились по всему миру в основном за счет передачи через потребителей инъекционных наркотиков, а также завозились инфицированными мигрантами в Россию, Европу и Северную Америку. Соответственно, субтипы 3a в Европе и России могут существенно отличаться от субтипов 3a в Средней Азии и в Индостане. В данном исследовании было выявлено только два изолята генотипа 3. Так как мы исследовали группу больных ХВГС с умеренной и высокой вирусной нагрузкой, низкая встречаемость генотипа 3 ВГС в данной группе не противоречит вышеизложенным данным. Однако нуклеотидная последовательность наших изолятов отличается от представленных в базе данных изолятов, выявленных на территории РФ ранее, и изолятов из других стран (максимальный процент нуклеотидной идентичности составил 97%) (рис. 6).

Можно предположить, что обнаруженный в данном исследовании изолят ВГС субтипа 3a импортирован из стран Индостана или других стран Южной и Средней Азии, где эволюция и эпидемиология гепатита С могут отличаться от тех, что представлены в европейских странах.

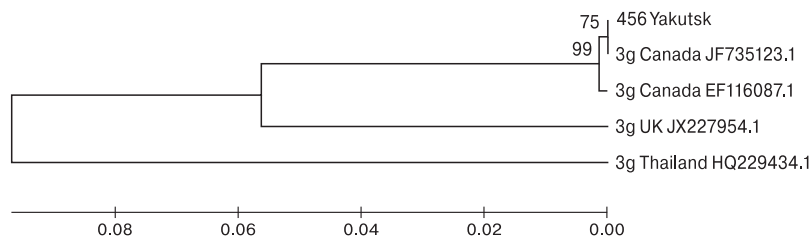
Тем не менее, процент идентичности нуклеотидной последовательности между изолятом № 157 и штаммом GQ388011.1 из Новосибирска составил 91%. Поскольку, как уже было упомянуто, нуклеотидные последовательности ВГС из России слабо представлены в международной базе данных, разница между ними, равная 9%, для таких крупных регионов не является существенной. Масштабный скрининг ВГС в Российской Федерации позволило бы оценить пути распространения и время эволюционного разделения изолятов вируса.

Особенный интерес представляет впервые выявленный на территории РФ ВГС субтип 3g. Выбранная нами для генотипирования область



**Рисунок 5. Дендрограмма, характеризующая филогенетические отношения изолятов ВГС субтипа 2a, выделенных от пациентов с ХВГС из разных регионов Якутии, в сравнении с представленными в международной базе данных последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из РФ, Китая и Японии**





**Рисунок 7. Дендрогрaмма, характеризующая филогенетические отношения изолята ВГС субтипа 3g, выделенного от пациента с ХВГС из Якутска, в сравнении с представленными в международной базе данных Genbank последовательностями максимально идентичных штаммов ВГС из РФ и других стран**

рубежные страны, в том числе в экзотические. Вероятнее всего, заражение произошло в одной из стран арабского региона. Данное обстоятельство демонстрирует необходимость пристального наблюдения отечественных эпидемиологов и инфекционистов за эпидемиологической ситуацией не только в РФ, но и в других странах.

Таким образом, становятся очевидными причины, по которым необходимо масштабное скринирование изолятов ВГС в Российской Федерации с использованием прямого секвенирования последовательностей.

Выявление 3g субтипа ВГС в нашем исследовании и генотипа 4 в другом исследовании, проведенном среди пациентов с ХВГС из Якутии, показывает, что на территории РФ могут встречаться редкие и экзотические субтипы ВГС, которые не определяются коммерческими наборами. Таким образом, эпидемиологическая картина в регионах оказывается неполной.

Генотипирование с использованием прямого секвенирования позволяет точно определить

субтип генотипа ВГС, независимо от ограничений, свойственных для коммерческих наборов. Для установления способа заражения и оценки распространенности инфекции необходим филогенетический анализ вируса, что не представляется возможным без использования прямого секвенирования изолятов.

Исследование распределения генотипов часто проводится в крупных городах, таких как Москва, Санкт-Петербург и Новосибирск. Однако распределение генотипов ВГС в крупных городах может существенно отличаться от распределения генотипов ВГС в различных регионах РФ.

Использование комплекса молекулярных, вирусологических, демографических и эпидемиологических методов будет способствовать пониманию текущей эпидемиологической ситуации по ВГС в России.

Систематическое применение молекулярной филогенетики может быть использовано для повышения качества надзора и выявления новых инфекционных кластеров.

## Список литературы/References

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 9 выпуск / Под ред. Покровского В.И., Жебруна А.Б. СПб.: ФБУН НИИЭМ им. Пастера, 2013. 168 с. [Virusnye gepatity v Rossiiskoi Federatsii. Analiticheskii obzor. 9 vypusk. Pod red. Pokrovskogo V.I., Zhebruna A.B. [Viral hepatitis in the Russian Federation. Analytical review. 9th issue. Eds V.I. Pokrovskiy, A.B. Zhebrun]. *St. Petersburg Pasteur Institute, 2013, 168 p.*]
2. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Саха (Якутия) в 2013 г.: Госуд. доклад. Якутск: Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия). 2013. 282 с. [About sanitary and epidemiological situation in the Republic of Sakha (Yakutia) in 2013. *Yakutsk: State report. Yakutsk Rospotrebnadzor for the Republic of Sakha (Yakutia). 2013, 282 p. (In Russ.)*]
3. Самохвалов Е.И., Николаева Л.И., Альховский С.В., Хлопова И.Н., Макашова В.В., Петрова Е.В., Сапронов Г.В., Беляева Н.М., Львов Д.К. Частота встречаемости отдельных субтипов вируса гепатита С в Московском регионе // Вопросы вирусологии. 2013. № 58 (1). С. 36–40. [Samokhvalov E.I., Nikolaeva L.I., Al'khovskii S.V., Khloпова V.V., Petrova E.V., Saponov G.V., Beliaeva N.M., L'vov D.K. Frequency of detection of different hepatitis C virus subtypes in the Moscow region]. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 36–40. (In Russ.)*]
4. Семенов С.И., Терехова М.В., Индеева Л.Д., Павлов Н.Н., Тихонова Н.Н., Кузин С.Н., Писарева М.М., Грудинин М.П., Балахонцева Л.А., Серкина Т.П. Распространенность и генетическая характеристика вируса гепатита С в Якутии // Якутский медицинский журнал. 2009. № 2 (26). С. 129–132. [Semenov S.I., Terehova M.V., Indeeva L.D., Pavlov N.N., Tihonova N.N., Cusin S.N., Pisareva M.M., Grudinina M.P., Balahontseva L.A., Serkina T.P. Hepatitis C prevalence and genetic characteristic in Yakutia]. *Yakutskii meditsinskii zhurnal = Yakut Medical Journal, 2009, vol. 2 no. 26, pp. 129–132. (In Russ.)*]
5. Степанова Г.И., Алексеева М.Н., Слепцова С.С. Клинические особенности хронического вирусного гепатита С в Республике (Саха) Якутия // Фундаментальные исследования. 2004. № 2. С. 97–98 [Stepanova G.I., Alekseeva M.N., Sleptsova S.S. Clinical features of chronic hepatitis C in the republic (Sakha) Yakutia]. *Fundamental'nye issledovaniya = Basic Research, 2004, no. 2, pp. 97–98. (In Russ.)*]



6. Ahmed A.M., Hassan M.S., Abd-Elseyed A., Hassan H., Hasanain A.F., Helmy A. Insulin resistance, steatosis, and fibrosis in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus infection. *Saudi J. Gastroenterol.*, 2011, vol. 17 no. 4, pp. 245–251. doi: 10.4103/1319-3767.82578
7. Ambrozaitis A., Agminas K.S., Balc I.G., Widell A. Hepatitis C in Lithuania: incidence, prevalence, risk factors and viral genotypes. *Clin. Diagn. Virol.*, 1995, vol. 4 no. 4, pp. 273–284.
8. Batash S., Khaykis I., Raicht R.F., Bini E.J. High prevalence of hepatitis C virus infection among immigrants from the former Soviet Union in the New York City metropolitan area: results of a community based screening program. *Am. J. Gastroenterol.*, 2008, vol. 103, no. 4, pp. 922–927. doi: 10.1111/j.15720241.2008.01789.x
9. Blatt L.M., Mutchnick M.G., Tong M.J., Klion F.M., Lebovics E., Freilich B., Bach N., Smith C., Herrera J., Tobias H., Conrad A., Schmid P., McHutchison J.G. Assessment of hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. *J. Viral. Hepat.*, 2000, vol. 7, no. 3, pp. 196–202. doi: 10.1046/j.1365-2893.2000.00221.x
10. Bracho M.A., Saludes V., Martró E., Bargalló A., González-Candelas F., Ausina V. Complete genome of a european hepatitis C virus subtype 1g isolate: phylogenetic and genetic analyses. *Virol. J.*, 2008, vol. 5, pp. 72–79. doi: 10.1186/1743-422X-5-72
11. Cavalheiro Nde P., De La Rosa A., Elagin S., Tengan F.M., Araújo E.S., Barone A.A. Hepatitis C: sexual or intrafamilial transmission? Epidemiological and phylogenetic analysis of hepatitis C virus in 24 infected couples. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2009, vol. 42, no. 3, pp. 239–244.
12. Chamberlain R.W., Adams N.J., Taylor L.A., Simmonds P., Elliott R.M. The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant genotype in South Africa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, vol. 236, pp. 44–49.
13. Chuang W.L., Yu M.L. Host factors determining the efficacy of hepatitis C treatment. *J. Gastroenterol.*, 2013, vol. 48, no. 1, pp. 22–30. doi: 10.1007/s00535-012-0669-x
14. Cramp M.E., Rosenberg W.M., Ryder S.D., Blach S., Parkes J. Modelling the impact of improving screening and treatment of chronic hepatitis C virus infection on future hepatocellular carcinoma rates and liver-related mortality. *BMC Gastroenterol.*, 2014, vol. 14, pp. 137–47. doi: 10.1186/1471-230X-14-137
15. De Bruijne J., Schinkel J., Prins M., Koekkoek S.M., Aronson S.J., van Ballegooijen M.W., Reesink H.W., Molenkamp R., van de Laar T.J. Emergence of hepatitis C virus genotype 4: phylogenetic analysis reveals three distinct epidemiological profiles. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 12, pp. 3832–3838. doi: 10.1128/JCM.01146-09
16. Debojyoti B., Kheya M., Goutam C., Ranadeep G., Nabarun M., Mohua B. Correlation study between HCV genotypes distribution pattern and viral load in a tertiary care hospital in Kolkata, India. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2015, vol. 9 no. 5, pp. DC15–17. doi: 10.7860/JCDR/2015/12701.5977
17. Demetriou V.L., Kostrikis L.G. Nearfull genome characterization of unclassified hepatitis C virus strains relating to genotypes 1 and 4. *J. Med. Virol.*, 2011, vol. 83, pp. 2119–2127. doi: 10.1002/jmv.22237
18. Dustin L.B., Rice C.M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 25, pp. 71–99.
19. EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2011, vol. 55, pp. 245–264. doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.023
20. Esmat G., Hashem M., El-Raziky M., El-Akel W., El-Naghy S., El-Koofy N. Risk factors for hepatitis C virus acquisition and predictors of persistence among Egyptian children. *Liver Int.*, 2012, vol. 32, no. 3, pp. 449–456. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02643.x
21. Gededzha M.P., Selabe S.G., Kyaw T., Rakgole J.N., Blackard J.T., Mphahlele M.J. Introduction of new subtypes and variants of hepatitis C virus genotype 4 in South Africa. *J. Med. Virol.*, 2012, vol. 84, no. 4, pp. 601–607. doi: 10.1002/jmv.23215
22. Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B., American association for the study of liver diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 2009, vol. 49, no. 4, pp. 1335–1374. doi: 10.1002/hep.22759
23. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.*, 1992, vol. 8, no. 2, pp. 189–191.
24. Karchava M., Waldenström J., Parker M., Hallack R., Sharvadze L., Gatsrelia L., Chkhartishvili N., Dvali N., Dzigua L., Dolmazashvili E., Norder H., Tsertsvadze T. High incidence of the hepatitis C virus recombinant 2k/1b in Georgia: Recommendations for testing and treatment. *Hepatol. Res.*, 2015. doi: 10.1111/hepr.12505
25. Kavita S.L., Jyotsna A.J., Sandhya P.S., Badri N.T., Mohan Prasad V.G., Vidya A.A. Comparison of hepatitis C virus genotyping by 5' noncoding region and core based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and use of the assay for determining subtype distribution in India. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 11, pp. 5240–5244.
26. Kuiken C., Combet C., Bukh J., Shin I., Deleage G., Mizokami M., Richardson R., Sablon E., Yusim K., Pawlotsky J.M., Simmonds P. A comprehensive system for consistent numbering of HCV sequences, proteins and epitopes. *Hepatology*, 2006, vol. 44, no. 5, pp. 1355–1361.
27. Kuiken C., Simmonds P. Nomenclature and numbering of the hepatitis C virus. *Methods. Mol. Biol.*, 2009, vol. 510, pp. 33–53. doi: 10.1007/978-1-59745-394-3\_4
28. Kurbanov F., Tanaka Y., Sugauchi F., Kato H., Ruzibakiev R., Zalyalieva M., Yunusova Z., Mizokami M. Hepatitis C virus molecular epidemiology in Uzbekistan. *J. Med. Virol.*, 2003, vol. 69, no. 3, pp. 367–375.
29. Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.*, 2009, vol. 29, suppl. 1, pp. 74–81. doi: 10.1111/j.14783231.2008.01934.x
30. Li C., Lu L., Wu X., Wang C., Bennett P., Lu T., Murphy D. Complete genomic sequences for hepatitis C virus subtypes 4b, 4c, 4d, 4g, 4k, 4l, 4m, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r and 4t. *J. Gen. Virol.*, 2009, vol. 90, pt. 8, pp. 1820–1826. doi: 10.1099/vir.0.010330-0
31. Li C., Cao H., Lu L., Murphy D. Full-length sequences of 11 hepatitis C virus genotype 2 isolates representing five subtypes and six unclassified lineages with unique geographical distributions and genetic variation patterns. *J. Gen. Virol.*, 2012, vol. 93, pt. 6, pp. 1173–1184. doi: 10.1099/vir.0.038315-0

32. Linqi Z., Zhiwei C., Yunzhen C., Jian Y., Guanghan L., Wenjie Y., Ning Y., Shan M., Li L., Balfé P., Tian H., Lei B., Fengwen Z., His-Hsun L., Man-Fung Y., Ching-Lung L., David D.H. Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus in paid blood donors and injection drug users in China. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 24, pp. 13591–13599. doi: 10.1128/JVI.78.24.1359113599.2004
33. Lu L., Li C., Fu Y., Thaikruea L., Thongswat S., Maneekarn N., Apichartpiyakul C., Hotta H., Okamoto H., Netski D., Pybus O.G., Murphy D., Hagedorn C.H., Nelson K.E. Complete genomes for hepatitis C virus subtypes 6f, 6i, 6j and 6m: viral genetic diversity among Thai blood donors and infected spouses. *J. Gen. Virol.*, 2007, vol. 88, pt. 5, pp. 1505–1518.
34. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Maksyutov A.Z., Kanev A.N. Genotyping of hepatitis B and C virus Russian isolates for reference serum panel construction. *J. Med. Virol.*, 2015, vol. 87, no. 7, pp. 1192–1198. doi: 10.1002/jmv.24170
35. Murphy D.G., Sablon E., Chamberland J., Fournier E., Dandavino R., Tremblay C.L. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from central Africa. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 3, pp. 967–972. doi: 10.1128/JCM.02831-14
36. Myers R.P., Krajden M., Bilodeau M., Kaita K., Marotta P., Peltekian K., Ramji A., Estes C., Razavi H., Sherman M. Burden of disease and cost of chronic hepatitis C infection in Canada. *Can. J. Gastroent. Hepatol.*, 2014, vol. 28, no. 5, pp. 243–250.
37. Newman R.M., Kuntzen T., Weiner B., Berical A., Charlebois P., Kuiken C., Murphy D.G., Simmonds P., Bennett P., Lennon N.J., Birren B.W., Zody M.C., Allen T.M., Henn M.R. Whole genome pyrosequencing of rare hepatitis C virus genotypes enhances subtype classification and identification of naturally occurring drug resistance variants. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 208, no. 1, pp. 17–31. doi: 10.1093/infdis/jis679
38. Nishiya A.S., de Almeida-Neto C., Ferreira S.C., Alencar C.S., Di-Lorenzo-Oliveira C., Levi J.E., Salles N.A., Mendrone A. Jr, Sabino E.C. HCV genotypes, characterization of mutations conferring drug resistance to protease inhibitors, and risk factors among blood donors in São Paulo, Brazil. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 1, e86413. doi: 10.1371/journal.pone.0086413
39. Ohno T., Lau J.Y. The “gold-standard”, accuracy, and the current concepts: hepatitis C virus genotype and viremia. *Hepatology*, 1996, vol. 24, no. 5, pp. 1312–1315.
40. Olinger C.M., Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Muller C.P. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, vol. 14, no. 6, pp. 575–581. doi: 10.1111/j.14690691.2008.01988.x
41. Paintsil E., Verevokhin S.V., Dukhovlina E., Niccolai L., Barbour R., White E., Toussova O.V., Alexander L., Kozlov A.P., Heimer R. Hepatitis C virus infection among drug injectors in St. Petersburg, Russia: social and molecular epidemiology of an endemic infection. *Addiction*, 2009, vol. 104, no. 11, pp. 1881–1890. doi: 10.1111/j.13600443.2009.02687.x
42. Panigrahi A.K., Roca J., Acharya S.K., Jameel S., Panda S.K. Genotype determination of hepatitis C virus from northern India: identification of a new subtype. *J. Med. Virol.*, 1996, vol. 48, no. 2, pp. 191–198.
43. Semjonov S.I., Savvin R.G., Nikitina S.G., Maximova S.S., Sleptsova S.S. Parenteral viral hepatitis (B, C, D) in the Sakha Republic (Yakutia). *Life Sci. J.*, 2014, vol. 11, no. 8, pp. 454–458.
44. Sharma S., Carballo M., Feld J.J., Janssen H.L. Immigration and viral hepatitis. *J. Hepatol.*, 2015, vol. 63, no. 2, pp. 515–522. doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.026
45. Sharvadze L., Nelson K.E., Imnadze P., Karchava M., Tsertsvadze T. Prevalence of HCV and genotypes distribution in general population of Georgia. *Georgian Med. News*, 2008, vol. 165, pp. 71–77.
46. Shustov A.V., Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Gavrilova I.V., Akinfeeva L.A., Rakova I.G., Aleshina M.V., Bukin V.N., Orlovsky V.G., Bepalov V.S., Robertson B.H., Netesov S.V. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Western Siberia. *J. Med. Virol.*, 2005, vol. 77, no. 3, pp. 382–389.
47. Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deleage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspe G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D.G., Okamoto H., Pawlotsky J.M., Penin F., Sablon E., Shin I T., Stuyver L.J., Thiel H.J., Viazov S., Weiner A.J., Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005, vol. 42, no. 4, pp. 962–973. doi: 10.1002/hep.20819
48. Simmonds P., Mellor J., Sakuldamrongpanich T., Nuchaprayoon C., Tanprasert S., Holmes E.C., Smith D.B. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. *J. Gen. Virol.*, 1996, vol. 77, pt. 12, pp. 3013–3024.
49. Singh P., Bhatia V., Pandey M., Shashank M., Tidke P., Jha N., Dutt S. HCV genotypes distribution pattern & its association with viral load in India. *Int. J. Recent Sci. Res.*, 2013, vol. 4, no. 11, pp. 1682–1684.
50. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J.T., Simmonds P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 2014, vol. 59, no. 1, pp. 318–327. doi: 10.1002/hep.26744
51. Sominskaya I., Mihailova M., Jansons J., Emelyanova V., Folkmane I., Smagris E., Dumpis U., Rozentals R., Pumpens P. Hepatitis B and C virus variants in longterm immunosuppressed renal transplant patients in Latvia. *Intervirology*, 2005, vol. 48, no. 2–3, pp. 192–200.
52. Tallo T., Norder H., Tefanova V., Krispin T., Schmidt J., Ilmoja M., Orgulas K., Pruunsild K., Priimagi L., Magnius L.O. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: fluctuations in the predominating subtype with time. *J. Med. Virol.*, 2007, vol. 79, no. 4, pp. 374–382.
53. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

54. Van de Laar T.J., Koppelman M.H., van der Bij A.K., Zaaier H.L., Cuijpers H.T., van der Poel C.L., Coutinho R.A., Bruisten S.M. Diversity and origin of hepatitis C virus infection among unpaid blood donors in the Netherlands. *Transfusion*, 2006, vol. 46, no. 10, pp. 1719–1728.
55. Viazov S., Kuzin S., Paladi N., Tchernovetsky M., Isaeva E., Mazhul L., Vasychova F., Widell A., Roggendorf M. Hepatitis C virus genotypes in different regions of the former Soviet Union (Russia, Belarus, Moldova and Uzbekistan). *J. Med. Virol.*, 1997, vol. 53, no. 1, pp. 36–40.
56. Yu M.L., Chuang W.L. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, vol. 24, no. 3, pp. 336–345. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05789.x
57. Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, vol. 13, no. 2, pp. 223–235.

**Авторы:**

**Семенов А.В.**, к.б.н., зав. лабораторией вирусологии и иммунологии ВИЧ-инфекции ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; доцент кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ; доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Останкова Ю.В.**, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Герасимова В.В.**, научный сотрудник учебно-научной лаборатории геномной медицины клиники медицинского института ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия;

**Бичурина М.А.**, д.м.н., зав. лабораторией этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Козлов А.В.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Мукомолов С.Л.**, д.м.н., профессор, зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

**Тотolian А.А.**, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Semenov A.V.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Virology and Immunology HIV, St. Petersburg Pasteur Institute; Associate Professor, Pavlov First St. Petersburg State Medical University; Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Ostankova Ju.V.**, Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Gerasimova V.V.**, Researcher of the University Laboratory of Genome Medicine, Clinic of Medical Institute, Northeast Federal University named after M.K. Ammosov, Yakutsk, Russian Federation, Yakutsk, Russian Federation;

**Bichurina M.A.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kozlov A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Mukomolov S.L.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Virus Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

**Totolian Areg A.**, Corresponding Member of RAS, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, St. Petersburg Pasteur Institute; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.

# СПОСОБ ОТБОРА ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ МОРСКИХ СВИНОК

Н.В. Анисимов, Т.И. Комбарова, М.Е. Платонов, С.А. Иванов, М.А. Сухова, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов

ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область, Россия

**Резюме.** Сравнительный анализ близкородственных вирулентных и авирулентных штаммов микроорганизмов на уровне геномов, транскриптомов и/или протеомов лежит в основе поиска новых факторов патогенности — потенциальных молекулярных мишеней для этиотропного лечения, вакцинопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. Целью настоящей работы была апробация способа анимализации «полевочьих» штаммов чумного микроба, авирулентных для морских свинок при подкожном заражении, позволяющего отобрать филогенетически близкие пары штаммов, которые отличаются по степени патогенности для морских свинок. Анимализацию культур *Y. pestis* проводили на самцах морских свинок четырехкратными тестикулярными пассажами со снижением инфицирующей дозы. Отсутствовала взаимосвязь между способностью вызывать генерализованный инфекционный процесс (гибель) при тестикулярном и подкожном заражении морских свинок, но при тестикулярном пассировании в культуре бактерий было возможно накопление субпопуляции, обладающей высокой вирулентностью и при подкожном заражении этого вида животных. Использованный методический подход может быть успешно применен для подбора филогенетически близких пар бактериальных штаммов, принципиально отличающихся по степени их избирательной вирулентности.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, полевочьи штаммы, избирательная вирулентность, морские свинки, анимализация, тестикулярные пассажи.

## SELECTION OF PHYLOGENETICALLY CLOSELY-RELATED *YERSINIA PESTIS* STRAINS DIFFERING IN THEIR VIRULENCE FOR GUINEA PIGS

Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

**Abstract.** Genomic, transcriptome or (and) proteomic comparison of closely related virulent and avirulent microbial strains underlies the search for new pathogenicity factors, potential molecular targets for etiotropic therapy, vaccine prevention and immunotherapy of infectious diseases. This investigation was aimed in testing the ability of method of testicular animalization to select

### Адрес для переписки:

Анисимов Андрей Павлович  
142279, Россия, Московская область, п. Оболенск,  
ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии.  
Тел.: 8 (4967) 36-01-17. Факс: 8 (4967) 36-00-10.  
E-mail: a-p-anisimov@yandex.ru

### Contacts:

Andrey P. Anisimov  
142279, Russian Federation, Moscow Region, Obolensk, State  
Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology.  
Phone: +7 (4967) 36-01-17. Fax: +7 (4967) 36-00-10.  
E-mail: a-p-anisimov@yandex.ru

### Библиографическое описание:

Анисимов Н.В., Комбарова Т.И., Платонов М.Е., Иванов С.А., Сухова М.А., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Способ отбора филогенетически близких штаммов *Yersinia pestis*, отличающихся по вирулентности для морских свинок // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 373–376. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376

### Citation:

Anisimov N.V., Kombarova T.I., Platonov M.E., Ivanov S.A., Sukhova M.A., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Selection of phylogenetically closely-related *Yersinia pestis* strains differing in their virulence for guinea pigs // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 373–376. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-373-376

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-15-00599).



phylogenetically close pairs of *Y. pestis* strains, which dramatically differ in their pathogenicity for guinea pigs, from the populations of as a rule subcutaneously avirulent for guinea pigs “vole” strains of the plague pathogen. Animalization of *Y. pestis* cultures were performed on guinea pig males by fourfold testicular passage with reducing infective dose. There was no correlation between the ability to cause generalized infectious process (death) after testicular and subcutaneous infection of guinea pigs, but testicular passages made it possible to enrich bacterial culture with a portion of microbes displaying high virulence after subcutaneous infection of this animal species. The methodical approach under study can be successfully applied for selection of pairs of phylogenetically closely related bacterial strains, dramatically differing in their degrees of selective virulence.

**Key words:** *Yersinia pestis*, vole strains, selective virulence, guinea pigs, animalization, testicular passage.

## Введение

Сравнительный анализ вирулентных и авирулентных штаммов (в идеале изогенных или хотя бы из одного клонального кластера) на уровне геномов, транскриптомов и/или протеомов лежит в основе современных подходов, направленных на изучение молекулярных механизмов патогенеза инфекционных болезней и поиск новых факторов патогенности болезнетворных микробов — потенциальных молекулярных мишеней для этиотропного лечения, вакцинопрофилактики и иммунотерапии [4]. Классической моделью при изучении взаимоотношений бактериальных патогенов с организмом хозяина является возбудитель чумы — *Yersinia pestis* [8]. Внутривидовая изменчивость привела к формированию широкого спектра внутривидовых групп (биоваров, подвидов, экотипов, плазмидоваров, генотипов и т.д.) *Y. pestis*, адаптированных к циркуляции в популяциях более 200 видов диких грызунов и отличающихся по спектру чувствительных к ним млекопитающих и по вирулентности. «Классические» штаммы чумного микроба основного подвида, циркулирующие в популяциях сурков, сусликов, песчанок, крыс, морских свинок и луговых собачек, обладают, как правило, «универсальной» вирулентностью, вызывая летальную инфекцию как у мелких грызунов, так и у людей. Штаммы же *Y. pestis*, выделенные из популяций различных видов полевок, высоковирулентны для своих основных хозяев и лабораторных мышей, но, за редким исключением, авирулентны для морских свинок и человека [9]. Незначительное число полевочьих изолятов, циркулирующих в тех же географических регионах, что и штаммы с избирательной вирулентностью, сохранили высокую вирулентность для морских свинок ( $LD_{50}$  от  $10$  до  $10^2$  КОЕ). Так, несмотря на филогенетическую близость, изоляты *Y. pestis*, выделенные из Ленинанканского горного очага, были более вирулентными для морских свинок, чем штаммы из Занзегурско-Карабахского очага [3]. Сравнение на полногеномном, транскриптомном и/или протеомном уровне филогенетически близких штаммов возбудителя чумы, принципиально отличающихся по своей вирулентности в отношении морских свинок (человека?), предоставляет возможность выявления новых потенциальных молекуляр-

ных мишеней (факторов патогенности?) для специфической профилактики и/или терапии чумы. В настоящей публикации представлен апробированный нами способ анимализации штаммов *Y. pestis*, позволяющий отобрать филогенетически близкие штаммы чумного микроба, отличающиеся по вирулентности для морских свинок.

## Материалы и методы

В работе использовали 60 штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск», 310 беспородных белых мышей обоего пола ( $19 \pm 2$  г), разведенных в ГНЦ ПМБ, и 109 беспородных морских свинок обоего пола ( $225 \pm 25$  г) из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Солнечногорский район, п. Андреевка (Московская область). Штаммы для заражения лабораторных животных выращивали в течение 48 ч при температуре  $28^\circ\text{C}$  на агаре Хоттингера производства ФГБУН ГНЦ ПМБ. Генотипирование изолятов чумного микроба проводили как описано ранее [10].

Выбор штаммов для тестикулярной анимализации [2] проводили путем подкожного заражения четырехсуточной культурой каждого из изолятов четырех беспородных белых мышей (по две мыши на дозы 100 и 1000 КОЕ в объеме 0,1 мл). В последующие эксперименты брали культуры, выделенные от животных, павших от меньшей дозы в наиболее ранние сроки (время наблюдения 10 сут) в группах, где погибли все четыре мыши. Тестикулярные пассажи проводили четырехкратно со снижением инфицирующей дозы после двух раундов анимализации с  $10^9$  до  $10^8$  КОЕ (в объеме 0,1 мл). Непосредственно перед тестикулярным заражением проводили анестезию 0,2% раствором «Рометара» (Bioveta, Чехия). Раствор вводили в объеме 0,5 мл подкожно, в паховую складку. Если животные не погибали в течение четырех суток, их умерщвляли. Для последующих пассажей брали культуры, выделенные из органов (мозг или селезенка), удаленных от места введения бактерий.

Оценку величин  $LD_{50}$  проводили при подкожном заражении беспородных белых мышей и морских свинок 10-кратными разведениями 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом

растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Брали по четыре животных на одну дозу. Для мышей диапазон заражающих доз составил  $10^3$ –1 КОЕ, а для морских свинок —  $10^6$ –10 КОЕ. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. За оставшимися животными наблюдали 21 день, затем умерщвляли. Вычисление величин  $LD_{50}$  проводили по методу Kärber [5].

## Результаты и обсуждение

Известно, что во время многолетнего коллекционного хранения штаммы патогенных бактерий часто утрачивают целый ряд признаков, описанных при выделении. В первую очередь, это касается снижения в популяции доли микробных клеток, сохранивших вирулентность на исходном уровне. Большинство «полевочьих» штаммов, хранящихся в «ГКПМ-Оболensk», выделены до распада СССР в природных очагах чумы, расположенных вне территории РФ [3]. Получение свежих изолятов микроорганизмов первой группы патогенности из-за рубежа практически невозможно в силу политических причин.

Показано, что при подкожном введении морским свинкам в одном шприце смеси вирулентных и авирулентных бактерий чумного микроба, при содержании в смеси первых менее 1/1000, возможно развитие так называемого «феномена переживания» Н.Н. Гинсбурга [1], при котором процесс в организме животного протекает не как инфекционный, а как вакцинальный: накопления вирулентных бактерий не происходит. В связи с этим было решено использовать методический подход, применяемый для повышения остаточной вирулентности/иммуногенности вакцинного штамма чумного микроба [2], последовательные тестикулярные пассажи микробной культуры через организм морской свинки. Гемато-тестикулярный барьер препятствует попаданию дифференцирующихся половых клеток в кровь и в лимфу, то есть развитию аутоиммунной реакции [12] и, соответственно, защищает введенные внутритестикулярно бактерии от иммунной системы хозяина, позволяя именно вирулентным клеткам размножаться с опережением, накапливаться и вызывать генерализованную инфекцию.

Предварительно вирулентность 60 коллекционных штаммов *Y. pestis* subsp. *microtus* (54 штамма bv. *caucasica* и 6 штаммов bv. *ulegeica*) оценивали на модели беспородных белых мышей, что позволило отобрать 13 высоковирулентных штаммов чумного микроба (9 — bv. *caucasica* и 4 — bv. *ulegeica*), подкожное введение которых привело к гибели в более ранние сроки всех инфицированных животных.

Анализ данных о способности штаммов чумного микроба вызывать после тестикулярного

введения генерализацию инфекции и гибель морских свинок, а также изучения тяжести патоморфологических изменений при чумной инфекции послужили основой для выбора штаммов для дальнейших исследований. У морских свинок, использованных для пассажей, наблюдали сходную патоморфологическую картину независимо от принадлежности заражающего штамма к биовару *caucasica* или *ulegeica*. У животных, павших на 1–2 сут после заражения, отмечали увеличение в размерах регионарных лимфатических узлов с геморрагической инфильтрацией; увеличение в размерах и полнокровие печени и селезенки. При гибели животных на 3–4 сут или при эвтаназии на 4 сут преобладали некротические изменения. Штаммы bv. *ulegeica* И-3189 и bv. *caucasica* С-290 после тестикулярных заражений вызывали гибель морских свинок на 1–4 сут и были отобраны как потенциально высоковирулентные. Остальные штаммы, требующие эвтаназии животных при пассировании, рассматривали в качестве авирулентных штаммов сравнения. Два штамма bv. *ulegeica*: И-2422, И-3189 и три — bv. *caucasica*: С-290, С-824, С-590 использовали для сравнительного определения вирулентности.

Величины  $LD_{50}$  для всех штаммов при подкожном заражении мышей не превышали 10 КОЕ. Для морских свинок оказался вирулентным только штамм bv. *ulegeica* И-3189 ( $LD_{50} = 68$  (17–271) КОЕ). Величины  $LD_{50}$  всех остальных штаммов (И-2422, С-290, С-824, С-590), включая субкультуру штамма И-3189, взятую до тестикулярных пассажей, превышали максимальную из использованных для подкожного заражения морских свинок дозу —  $10^6$  КОЕ. Таким образом, отсутствовала прямая зависимость между способностью вызывать генерализованный инфекционный процесс (гибель) при тестикулярном и подкожном заражении морских свинок, но при тестикулярном пассировании в культуре бактерий было возможно накопление субпопуляции, обладающей высокой вирулентностью и при подкожном заражении этого вида животных.

Использованный методический подход, заключающийся в анимализации путем последовательных тестикулярных пассажей, как правило, авирулентных для морских свинок при подкожном заражении «полевочьих» штаммов чумного микроба, может быть успешно применен для дифференциации бактериальных культур чумного микроба по степени их избирательной вирулентности. Отобранные в этих экспериментах филогенетически близкие пары штаммов *Y. pestis*, отличающихся по степени патогенности для морских свинок, будут подвергнуты полногеномному секвенсу и протеомному анализу с целью идентификации факторов избирательной вирулентности чумного микроба.

## Список литературы/References

1. Гинсбург Н.Н. Живые вакцины. История, элементы теории, практика. М.: Медицина, 1969. С. 304–313. [Ginsburg N.N., Zhivye vaksiny. Istoriya, elementi teorii, praktika [Live vaccines. History, elements of theory, practice]. Moscow: Meditsina, 1969, pp. 304–313].
2. Патент RU № 2510825. Способ получения препарата на основе вакцинного штамма чумного микроба: 2012. Опубл. 10.04.2014, Бюл. № 10. [Patent RU #2510825. Sposob polucheniya preparata na osnove vaksinnogo shtamma chumnogo mikroba [Method of obtaining preparation based on vaccine strain of plague microbe]: 2012, Publ. 10.04.2014, Bull. no. 10].
3. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, vol. 17, pp. 434–464.
4. Ellison D.W., Clark T.R., Sturdevant D.E., Virtaneva K., Porcella S.F., Hackstadt T. Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. *Infect. Immun.*, vol. 76, pp. 542–550.
5. Finney D.J. Statistical Method in Biological Assay. 3<sup>rd</sup> ed. Charles Griffin, London, 1978.
6. Johnson T.J., Abrahante J.E., Hunter S.S., Hauglund M., Tatum F.M., Maheswaran S.K., Briggs R.E. Comparative genome analysis of an avirulent and two virulent strains of avian *Pasteurella multocida* reveals candidate genes involved in fitness and pathogenicity. *BMC Microbiol.*, 2013, vol. 13:106. doi: 10.1186/1471-2180-13-106
7. Niikura M., Ono E., Yanagawa R. Molecular comparison of antigens and proteins of virulent and avirulent clones of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni, strain Shibaura. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A.*, 1987, vol. 266, pp. 453–462.
8. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* — etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, vol. 10, pp. 35–66.
9. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Molecular typing of *Yersinia pestis*. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.*, 2013, vol. 28, pp. 41–45.
10. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* vole strains isolated from natural foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.*, 2012, vol. 27, pp. 108–111.
11. Uda A., Sekizuka T., Tanabayashi K., Fujita O., Kuroda M., Hotta A., Sugiura N., Sharma N., Morikawa S., Yamada A. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One*, 2014, vol. 9, e89075.
12. Zhao S., Zhu W., Xue S., Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014, vol. 11, pp. 428–437. doi: 10.1038/cmi.2014.38

**Авторы:**

**Анисимов Н.В.**, аспирант лаборатории сибирской язвы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Комбарова Т.И.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биологических испытаний ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Платонов М.Е.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Иванов С.А.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Сухова М.А.**, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Дентовская С.В.**, д.м.н., зав. лабораторией микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия;  
**Анисимов А.П.**, д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск, Московская область, Россия.

**Authors:**

**Anisimov N.V.**, PhD Candidate, Laboratory of Antrax, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Kombarova T.I.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Biological Testing, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Platonov M.E.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Ivanov S.A.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Plague Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Sukhova M.A.**, PhD Candidate, Junior Researcher, Laboratory for Tularemia Microbiology, Department of Especially Dangerous Infectious Diseases, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Dentovskaya S.V.**, PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory for Plague Microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;  
**Anisimov A.P.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Science, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation.

# АГРЕГАЦИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOCA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Г.Р. Садртдинова

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия

**Резюме.** В статье подтверждается факт образования бактериальных биопленок у штаммов бактерий вида *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* при росте в жидких средах под действием негативного фактора (химического) — дезинфицирующего кислородосодержащего средства. Биопленки, как сообщества микроорганизмов, вызывают многие хронические инфекции (менингит, воспалительные заболевания полости рта, урогенитальные инфекции) и создают проблемы в промышленности (обрастания различного технологического оборудования, корпусов судов, нефтяных платформ, биокоррозия металлических изделий). Обычные дезинфицирующие средства, такие как хлор и хлорит натрия, не могут удалить биопленку, поэтому поиск эффективного средства борьбы с ними является достаточно актуальным направлением. Различные бактерицидные средства малоэффективны в борьбе с биопленками, так как бактерии вырабатывают большое количество полисахаридов — веществ, помогающих колонии не распасться. Слой полисахаридов служит барьером для веществ, находящихся в воде, в том числе и для биоцидов. Это и является основной причиной выживания микроорганизмов даже в условиях сильного хлорирования воды. При проведении исследований учитывались последние данные по проблеме, а именно работы о негативном воздействии кислорода на рост бактериальных клеток и его направляющем действии в качестве фактора образования биопленок. Влияющим фактором выступил дезинфектант последнего поколения. Рабочие концентрации были представлены в трех вариантах. Число изучаемых штаммов — 6 (по 3 штамма каждого вида). Все штаммы получены из музея кафедры МВЭиВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. В процессе исследования нами был подтвержден феномен образования биопленочного сообщества, отмечены различия образования биопленки в зависимости от интенсивности (в данном случае концентрации) провоцирующего фактора и вида бактерии. В естественных условиях биопленка легко разрушалась механическим воздействием (встряхивание пробирки со средой). Восстановления биопленки после данной манипуляции не наблюдалось. Результаты дальнейшего исследования на плотной среде (мясо-пептонном агаре) и последующая окраска мазков простым красителем (по Граму) факта гибели бактериальных клеток не подтвердили. Во всех случаях наблюдался бактериальный рост, характерный для данных видов бактерий. Исследования проводились в 2015 г. на базе Научно-исследовательского инновационного центра по микробиологии и биотехнологии (г. Ульяновск) и при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

**Ключевые слова:** бактерия, сообщества, агрегация, химический фактор, дезинфектант, биопленка.

---

**Адрес для переписки:**

Садртдинова Гузелия Рафиковна  
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,  
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8, Ульяновская ГСХА  
им. П.А. Столыпина.  
Тел.: 8 (953) 981-47-99.  
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

**Contacts:**

Guzeliia R. Sadrtdinova  
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinski  
district, Oktjabrski village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State  
Agricultural Academy named after P.A. Stolypin.  
Phone: +7 (953) 981-47-99.  
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

**Библиографическое описание:**

Садртдинова Г.Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 377–381. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-377-381

**Citation:**

Sadrtdinova G.R. The aggregation of bacteria *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* under the influence of chemical factors // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 377–381. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-377-381



## THE AGGREGATION OF BACTERIA *KLEBSIELLA OXYTOCA* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* UNDER THE INFLUENCE OF CHEMICAL FACTOR

Sadrtdinova G.R.

*Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russian Federation*

**Abstract.** The article acknowledges the formation of bacterial biofilms in strains of bacteria species *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* when grown in liquid media under the influence of negative factors (chemical factor) — containing agents. Biofilms, as a community of microorganisms cause many chronic infections (meningitis, inflammatory diseases of the oral cavity, urogenital infections) and create problems in the industry (fouling of processing equipment, ship hulls, oil platforms, biocorrosion metal products). Ordinary disinfectants, such as chlorine and sodium chlorite, can not remove the biofilm, so finding an effective means of dealing with them is enough actual problem. Various antibacterial agents are ineffective in combating biofilms, since bacteria produce large amounts of polysaccharides — substances that help the colony stay without disintegration. Polysaccharide serves as a barrier layer for substances in water, including for biocides. This is the main reason for the survival of microorganisms even in the heavily chlorinated water. In the study the latest data took into account on the subject, especially concerning adverse effects of oxygen on the growth of bacterial cells and directs action as a factor in the formation of biofilms. In our study we analyzed the latest generation disinfectant as an influencing factor. Working concentrations were shown in three embodiments. The number of strains studied was 6 (3 strains of each species). All strains were obtained from the Department of Museum MVE and VSE Ulyanovsk State Agricultural Academy n.a. P.A. Stolypin. In our research the biofilm community formation phenomenon has been confirmed, marked differences in biofilm formation, depending on the intensity (in this case, concentration) of the promoter and bacteria species. In vivo biofilm is easily destroyed by mechanical action (shaking test tubes with the medium). Biofilm recovery after this manipulation was not observed. The results of further studies on solid medium (meat-peptone agar) and the color smear simple dye (Gram) into the death of the bacterial cells have not been confirmed. In all cases, bacterial growth was observed, characteristic of these types of bacteria. The studies were conducted in 2015 on the basis of the Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology (Ulyanovsk) and with the financial support of the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in the scientific and technical sphere.

**Key words:** *bacterium, community, aggregation, chemical agent, disinfectant, biofilm.*

### Введение

Биопленки — пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, заключенные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз [2]. В природе около 99% микроорганизмов живут в составе биопленок. С практической точки зрения, наибольшую опасность представляют биопленки, вызывающие хронические инфекции и биокооррозию металлических изделий. По данным центра контроля заболеваний США, 65% всех инфекций обусловлены формированием в организме биопленок [6]. Они могут образовываться на всех внедряемых в организм человека медицинских устройствах (катетерах, ортопедических имплантатах). Наибольший интерес для исследователей представляют: *Staphylococcus aureus* и другие виды стафилококков, вызывающие широкий спектр заболеваний; *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*; *Escherichia coli*.

Биопленки могут образовываться на границах «жидкость (водная фаза)—воздух», «твердое тело—жидкость», «твердое тело—воздух»

и «жидкость—жидкость (две несмешивающиеся жидкости)». Многими авторами высказывается предположение, что рост бактерий в форме биопленок является формой ответа на разнообразные стрессы. Сейчас существует гипотеза, что бактерии в биопленках не только лучше переносят неблагоприятные воздействия внешней среды, но — более того — стрессовые условия стимулируют образование биопленок. Так, на *P. putida* и некоторых других видах грамотрицательных бактерий было показано, что такие неблагоприятные факторы как повышенная осмолярность, высокая температура и другие, стимулируют образование во внешней мембране мелких везикул [4]. Эти везикулы обогащены насыщенными жирными кислотами (особенно стеаратом); их образование делает поверхность клетки более гидрофобной, и, как следствие, повышается способность к адгезии клеток на твердые поверхности. Таким образом, появляется все больше доказательств большой способности бактерий приспособляться к негативному воздействию окружающей среды (причем всевозможных вариантов этого воздействия), что

дает повод ученым и медикам задуматься над привычными способами борьбы с бактериями и их усовершенствованием.

Одним из факторов окружающей среды, способным негативно влиять на рост бактериальных клеток, является кислород. Активные формы кислорода (АФК), индуцирующие окислительный стресс, способны повышать частоту мутаций в клетках, повышая, в частности, чувствительность к антибиотикам. На примере *S. aureus* было показано, что для защиты от действия АФК повышался уровень экспрессии генов *sodA* (супероксиддисмутазы) и *qoxA* (субъединица хинолоксидазы), которые, ликвидируя АФК, снижали частоту нежелательных мутаций. Однако окислительный стресс может служить и сигналом к включению некоторых функций в биопленке. Так, у того же *S. aureus* имеются белки MgrA, SarZ, и SarA семейства MarR, которые используют окисление цистеина для регулирования вирулентности и устойчивости к антибиотикам [3]. Помимо этого, у *S. epidermidis* был описан транскрипционный фактор AbfR, который регулирует экспрессию генов, ответственных за реакцию на окислительный стресс, а также коагрегацию клеток и формирование биопленки [6].

Цель исследования состояла в изучении влияния химического агента на процесс образования биопленок у бактерий рода *Klebsiella*.

## Материалы и методы

Работа проводилась на базе Научно-исследовательского инновационного центра по микробиологии и биотехнологии (НИИЦМиБ, г. Ульяновск) в 2015 г. Объектом исследова-

ния служили штаммы бактерий рода *Klebsiella*. Влияющим фактором выступил кислородо-содержащий дезинфектант последнего поколения. Бактерии рода *Klebsiella* хорошо растут на простых питательных средах, в том числе и мясо-пептонном бульоне (МПБ) в пределах 12–43°C (оптимальной температурой роста является предел 35–37°C). В жидких средах рост капсульных вариантов сопровождается равномерным помутнением, слизистым осадком и пленкой на поверхности бульона. Бескапсульные R-формы бактерий образуют гранулированный осадок с чистой и незамутненной надосадочной жидкостью. Культивирование бактерий на МПБ приводит к образованию пристеночного кольца. У фимбриеобразующих штаммов в течение нескольких дней на поверхности МПБ образуется поверхностная пленка [1, 5].

Культивирование проводили в течение 20 ч при 37°C. В качестве контроля использовали посеы изучаемых культур на МПБ.

## Результаты

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1 и на рисунке 1 (см. II обложку).

Согласно последним исследованиям, пагубное влияние на бактерии большинство дезинфектантов оказывают при концентрации 1,5%. Из данных таблицы 1 видно, что при концентрации химического агента в 2% во всех случаях видимого бактериального роста в пробирках не наблюдалось, что на первый взгляд может говорить о полной гибели бактериальных клеток. При концентрации в 0,5 и 1%, у всех штаммов бактерии *Klebsiella*

**ТАБЛИЦА 1. РОСТ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* НА МПБ ПРИ ОБРАБОТКЕ ПОСЕВОВ ДЕЗИНФЕКТАНТОМ**

Исследуемые штаммы	Концентрация химического агента, %			Контроль
	0,5	1	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5006	Помутнение по всему объему пробирки, образование пленки на разделе фаз «жидкость–воздух»	Помутнение по всему объему пробирки, образование пленки на разделе фаз «жидкость–воздух»	Прозрачный бульон, пристеночного или придонного роста не наблюдается	Помутнение по всему объему пробирки, образование пристеночного кольца
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5007				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 244		Прозрачный бульон, пристеночного или придонного роста не наблюдается		Помутнение по всему объему пробирки, образование сгустка на дне
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1				
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2				
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3				

**ТАБЛИЦА 2. НАЛИЧИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* НА МПА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИМ АГЕНТОМ**

Исследуемые штаммы	Концентрация химического агента, %			Контроль
	0,5	1	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5006	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5007	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 244	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3	+	+	+	+

**Примечание:** «+» — наличие роста; «-» — отсутствие роста.

*pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae* 5006, *Klebsiella pneumoniae* 5007, *Klebsiella pneumoniae* 244), помимо помутнения среды, наблюдалось образование достаточно хорошо видимой и плотной пленки.

У *Klebsiella oxytoca* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Klebsiella oxytoca* 3 при концентрации в 0,5% также наблюдалось помутнение среды и образование видимой, но, по сравнению с предыдущими штаммами, менее плотной пленки. При концентрации в 1% у *Klebsiella oxytoca* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Klebsiella oxytoca* 3 видимых изменений на среде не фиксировалось.

Для того, чтобы убедиться в наличии или отсутствии бактериальных клеток после взаимодействия с химическим агентом, нами был произведен посев культур из пробирок на мясо-пептонный агар (МПА) сплошным газонном. Культивирование на МПА производили в течение суток при 37°C. Параллельно, в качестве контроля, был произведен посев изучаемых штаммов (без обработки химическим агентом) на МПА. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 не подтверждают первоначальных выводов об отсутствии бактериальных клеток при росте на МПА после воздействия химическим агентом. Но стоит отметить, что на всех чашках наблюдался бактериальный рост, отличный от роста бактерии на контрольной чашке (рис. 2, II обложка).

Для подтверждения биопленочной природы уплотнения, образованного на МПА при разделе фаз «жидкость–воздух», была проведена окраска образованных в пробирках бляшек 0,1% раствором генцианвиолета в течение 20 мин (рис. 3, II обложка). Окраска генцианвиолетом образованных бляшек на поверхности МПА

после воздействия химическим агентом дает отличную от обычной окраски по Граму единичной колонии (контроль) картину.

Окраска мазков позволяет найти отличия в расположении клеток бактерии. Так, в первом случае наблюдается скопление бактериальных клеток, характеризующихся как плотнорасположенные. Во втором случае отмечается классический вариант расположения клеток бактерии *Klebsiella* — прямые грамтрицательные палочки, располагающиеся одиночно и парами.

## Обсуждение

Проведенное нами исследование позволяет делать выводы о том, что под действием негативного фактора в виде химического агента, бактерии рода *Klebsiella* способны к образованию биопленок. Биопленки, образованные в данных условиях, визуализируются при росте в жидкой среде (в данном случае в МПА). Образованные биопленки характеризуются средней плотности консистенцией, желто-бежевым цветом. При механическом воздействии (помешивании) биопленка разрушается без самопроизвольного восстановления.

## Благодарности

Выражаем благодарность Фонду содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и Научно-исследовательскому инновационному центру по микробиологии и биотехнологии» (г. Ульяновск) за финансовую поддержку проводимых исследований.

## Список литературы/References

1. Малинов Е.С., Васильев Д.А., Шестаков А.Г. Влияние уксуснокислого свинца на планктонные и биопленочные формы *Pseudomonas aeruginosa* // Ветеринария и кормление. 2012. № 5. С. 28–30. [Malinov E.S., Vasiliev D.A., Shestakov A.G. Effect of lead acetate on planktonic and biofilm forms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinariya i kormlenie = Veterinary Medicine and Feeding*, 2012, no. 5, pp. 28–30. (In Russ.)]
2. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // Микробиология. 2010. Т. 79, № 4. С. 447–458. [Plakunov V.K., Strelkova E.A., Zhurina M.V. Persistence and adaptive mutagenesis in biofilms. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 424–434. (In Russ.)]
3. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии // Вестник новых медицинских технологий. 2008. № 3. С. 175–177. [Seregina N.V., Tchestnova T.V., Zherbtsova V.A., Chromushin V.A. Review of biophysic particular features of microbial adhesion. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Herald of New Medical Technologies*, 2008, no. 3, pp. 175–177. (In Russ.)]
4. Baumgarten T., Sperling S., Seifert J. Membrane vesicle formation formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 17, pp. 6217–6224. doi: 10.1128/AEM.01525-12
5. Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*, 2006, pp. 159–196. doi: 10.1007/0-387-30746-x-8
6. Li Y., Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 2519–2538. doi: 10.3390/s120302519

---

**Автор:**

**Садрtdинова Г.Р.**, аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

**Author:**

**Sadrtidinova G.R.**, PhD Candidate, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation.

---

Поступила в редакцию 19.04.2015  
Отправлена на доработку 11.05.2015  
Принята к печати 09.07.2015

---

Received 19.04.2015  
Revision received 11.05.2015  
Accepted 09.07.2015



## ПАМЯТИ ОЛЕГА ИВАНОВИЧА КИСЕЛЕВА



Редакционная коллегия журнала «Инфекция и иммунитет» с глубоким прискорбием извещает о том, что 24 ноября 2015 года скоропостижно скончался академик РАН, директор НИИ гриппа, член редакционной коллегии журнала «Инфекция и иммунитет», Олег Иванович Киселев.

Олег Иванович родился 5 сентября 1945 года. Закончил Ленинградский государственный медицинский институт им. И.П. Павлова. По окончании института в 1968 году поступил в аспирантуру Научно-исследовательского института экспериментальной медицины АМН СССР (НИИЭМ), где в 1971 году защитил кандидатскую диссертацию по медицине, в 1982 году получил степень доктора биологических наук. С 1983 по 1988 годы работал в различных учреждениях Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР. С 1988 года возглавил Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа Министерства Здравоохранения СССР, которым руководил до последнего дня жизни.

Являясь одним из ведущих специалистов в области биохимии, молекулярной биологии вирусов, Олег Иванович руководил работами государственной важности по конструированию противовирусных препаратов, созданию генно-инженерных вакцин, обеспечению национальной безопасности. В качестве советника Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и руководителя Национального центра по гриппу ВОЗ внес неоценимый вклад в развитие международного сотрудничества по совершенствованию надзора за гриппом и ОРВИ.

Олег Иванович Киселев возглавлял Совет Санкт-Петербургского отделения Российского общества биохимиков и молекулярных биологов РАН, входил в состав редакционных коллегий научных и медицинских журналов. В частности, являлся активным членом редакционного совета журнала «Инфекция и иммунитет».

Теоретик и неутомимый исследователь, обладавший редким даром легко и просто излагать самые сложные научные проблемы, увлекать молодых людей новыми научными идеями, О.И. Киселев создал прекрасную школу учеников и последователей — молекулярных биологов и генных инженеров. Его педагогический талант признан не только в России: Олега Иванович — полный профессор университета штата Невада (США).

Олег Иванович Киселев — лауреат премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники, имел правительственные награды.

Российская школа вирусологов понесла невосполнимую утрату. Все, кто знал и ценил ум, мудрость, талант этого яркого человека, навсегда сохранят в сердцах светлую память об Олеге Ивановиче Киселеве.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://iimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Инфекция и иммунитет» и «Инструкцией для авторов», представленной на сайте.

### Основные виды статей, публикуемых в журнале

#### Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками.
- Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

#### Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано ниже (см. «Подготовка статей»). Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

#### Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

### Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

#### Описание статьи из журнала:

Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Иммунологические методы в дифференциальной диагностике // Туберкулез и болезни легких. 2011. Т. 88, № 11. С. 50–53.

Salina T.Yu., Morozova T.I. Immunological methods in differential diagnostics. Tuberculosis and Lung Diseases, 2011, vol. 88, no. 11, pp. 50–53.

#### Описание статьи из книги (монографии):

Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука, 2003. 320 с.

Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka, 2003. 320 p.

#### Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Turenne C.Y., Wallace R., Behr M.A. Mycobacterium avium in the postgenomic era. Clin. Microb. Rev., 2007, vol. 20, no. 2, pp. 205–229.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G. Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. Не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

### Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

### Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

#### Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

**Таблицы.** Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей.

Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (\*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (\*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

**Рисунки (графики и фотографии).** В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их включения в текст статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка в отдельный файл. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

#### Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

#### Подготовка статей

При предоставлении статьи авторы должны руководствоваться требованиями, приведенными в нижеследующих пунктах. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

1. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Так же авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Инфекция и иммунитет» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации или книги. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
3. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
  - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
    - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках);
    - название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах);
    - почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках);
    - телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail;
    - фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности;
    - полное название статьи, направляемой в редакцию;
    - количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц;
    - раздела журнала, для которого предназначена данная работа: «Лекции», «Обзоры», «Оригинальные статьи», «Краткие сообщения», «В помощь практическому врачу»;
    - дата отправления работы.
  - 2) Отсканированная копия файла с метаданными подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
  - 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
    - название статьи (без использования каких-либо сокращений, на русском и английском языках);
    - фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность каждого из соавторов статьи (полностью, на русском и английском языках);

- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа; в случае, если авторами статьи являются сотрудники разных учреждений, то последние нумеруются по порядку, начиная с единицы, и соответствующая цифра размещается после фамилии автора, представляющего данное учреждение; для маркировки авторов в англоязычной части статьи вместо цифр используются латинские буквы (a, b, c, d и т.д.);
  - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания, на русском и английском языках);
  - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
  - адрес для переписки с указанием номера телефона, факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
  - 5) Рисунки, если они есть — каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок\_Порядковый номер рисунка. Название рисунка»).
  - 6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf со списком, в котором указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные.
  - 7) Таблицы, если они есть — каждая отдельным файлом (название каждой таблицы должно быть приведены заголовком в файле с самой таблицей).
  - 8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература») в виде таблицы из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	Ф.И.О., название публикации и источника на английском языке	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или ее DOI
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована — для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий, редакция просит предоставлять их перевод, обозначая его красным цветом шрифта. <b>Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк</b>	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы <b>www.e-library.ru</b> . DOI статьи приводится в квадратных скобках после URL-адреса

4. Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://immun.ru>) в рубрике «Рецензирование» раздела «О журнале».

**Вы можете оформить подписку на журнал  
«Инфекция и иммунитет» через отделения связи:  
Каталог «Роспечать» — индекс 95001;  
Объединенный каталог «Пресса России» и электронный каталог «Российская периодика»  
в сети Internet на сайте [www.aprk.org](http://www.aprk.org) — индекс 41392.  
Цена свободная.  
Подписка на электронную версию журнала  
на сайте [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)**



## АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аль-Шехадат Р.И. ....	315	Левакова И.А. ....	297
Анисимов А.П. ....	373	Максимова Н.Р. ....	297
Анисимов Н.В. ....	373	Монахова Н.Е. ....	349
Анисимова Е.Н. ....	339	Мукомолов С.Л. ....	359
Беленюк В.Д. ....	339	Останкова Ю.В. ....	359
Бичурина М.А. ....	297, 359	Платонов М.Е. ....	373
Богомолова Е.Г. ....	315	Понасенко А.В. ....	331
Борисов А.Г. ....	339	Решетников И.В. ....	339
Герасимова В.В. ....	297, 359	Рутковская Н.В. ....	331
Головкин А.С. ....	331	Савченко А.А. ....	339
Дентовская С.В. ....	373	Садртдинова Г.Р. ....	377
Дмитриев А.В. ....	303	Семенов А.В. ....	359
Добровольская О.А. ....	315	Симбирцев А.С. ....	315
Духовлинов И.В. ....	315	Скрипченко Н.В. ....	349
Железникова Г.Ф. ....	349	Суровцева А.В. ....	349
Зорин А.Н. ....	339	Сухова М.А. ....	373
Иванов С.А. ....	373	Тотолян Арег А. ....	359
Иванова Г.П. ....	349	Федорова Е.А. ....	315
Калинина О.В. ....	303	Харченко Е.П. ....	323
Квятковская С.В. ....	339	Хуторная М.В. ....	331
Козлов А.В. ....	359	Цейликман В.Э. ....	339
Комбарова Т.И. ....	373	Черняева Е.Н. ....	315
Кудрявцев И.В., ....	339	Шосси М.С. ....	303
Кутихин А.Г. ....	331	Южалин А.Е. ....	331

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

агрегация ....	377	молекулярная эпидемиология ....	297, 359
анимализация ....	373	морские свинки ....	373
бактерия ....	377	мутации ....	297
белки-регуляторы ....	303	онихомикозы ....	339
биопленка ....	377	пандемический потенциал ....	323
вакцины ....	315	полевочки штаммы ....	373
вирулентность ....	303	прогнозирование пандемий ....	323
вирус гриппа А ....	323	распознавание образов ....	323
вирусная нагрузка ....	297	рассеянный склероз ....	349
вирусный гепатит В ....	297	рекомбинантный ТВ10.4 ....	315
внутренние белки ....	323	Республика Саха (Якутия) ....	359
воспалительный ответ ....	331	секвенирование ....	359
врожденный иммунитет ....	331	сообщества ....	377
ВЭБ-инфекция ....	349	способ очистки ....	315
генные полиморфизмы ....	331	стрептококки ....	303
генотип ....	297, 359	субгенотипы ....	297
генотипирование ....	359	субпопуляции моноцитов ....	339
гепатит С ....	359	субтип ....	359
герпесвирусы ....	349	тестикулярные пассажи ....	373
дезинфектант ....	377	транскрипция генов ....	303
дети ....	349	туберкулез ....	315
избирательная вирулентность ....	373	филогения ....	359
иммунный ответ ....	349	химический фактор ....	377
инвариантные паттерны ....	323	цитокины ....	349
инфекционный иммунитет ....	331	штамм-продуцент ....	315
инфекционный эндокардит ....	331	В-лимфоциты ....	339
культура клеток ....	315	Rgg-семейство ....	303
лейкоциты ....	339	Т-лимфоциты ....	339
метаболизм ....	303	TREM-1 ....	331
метод Nematoflow ....	339	<i>Yersinia pestis</i> ....	373

Единственный в России внутривенный иммуноглобулин с содержанием IgG 100 мг/мл.<sup>1</sup>

In the largest and longest clinical trial in CIDP  
**GAMUNEX** significantly improved  
CIDP patient outcomes



## ГАМУНЕКС® - ОПТИМАЛЬНЫЙ ВЫБОР ПРИ ТЕРАПИИ ВНУТРИВЕННЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ



Высокая концентрация IgG в препарате Гамунекс® позволяет в 2 раза снизить нагрузку объемом при сохранении высокой скорости инфузии<sup>2</sup>



Применение препарата Гамунекс® приводит к значительному сокращению продолжительности инфузии и экономии времени медицинского персонала и пациента<sup>3</sup>



Гамунекс® обладает оптимальными свойствами, что позволяет проводить безопасную терапию даже у пациентов с сопутствующими заболеваниями<sup>2,4</sup>



Гамунекс® значительно снижает частоту возникновения инфекций у пациентов с первичным иммунодефицитом, в том числе по сравнению с другими ВВИГ<sup>5</sup>



Гамунекс® обеспечивает быстрое повышение уровня тромбоцитов и его сохранение в пределах нормы у пациентов с идиопатической тромбоцитопенической пурпурой<sup>6</sup>

Литература: 1. Государственный реестр лекарственных средств 2010; 2. Инструкция по медицинскому применению препарата Гамунекс. ЛСР-002531/08 04.04.2008; 3. Gelfand EW, et al. Safety and Tolerability of Increased Rate of Infusion of Intravenous Immunoglobulin G, 10% in Antibody-Deficient Patients. Journal of Clinical Immunology. 2006; Volume 26, Number 3: 284-290; 4. Data on file. Talecris Biotherapeutics Inc. 5. Roifman CM, Schroeder H, Berger M, et al, and the IGIV-C in PID Study Group. Comparison of the efficacy of IGIV-C, 10% (caprylate/chromatography) and IGIV-SD, 10% as replacement therapy in primary immune deficiency: a randomized double-blind trial. Int Immunopharmacol. 2003;3:1325-1333; 6. Bussel JB, Eldor A, Kelton JG, et al, and the IGIV-C in ITP Study Group. IGIV-C, a novel intravenous immunoglobulin: evaluation of safety, efficacy, mechanisms of action, and impact on quality of life. Thromb Haemost. 2004;91:771-778;



**Talecris**  
BIOTHERAPEUTICS

ЗАО «Р-Фарм», 123154, Москва,  
ул. Берзарина, д.19, к.1  
тел: +7-495-956-79-37  
факс: +7-495-956-79-38

**гамунекс®**



иммуноглобулин человеческий  
нормальный 100 мг / 1 мл

**Доказано наукой. Подтверждено пациентами.**



**Подписной индекс:**  
Роспечать – 95001  
Пресса России – 41392

