

2018



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

- 
- С 2016 ГОДА ВКЛЮЧЕН В **WEB OF SCIENCE™** (Emerging Sources Citation Index)

ЖУРНАЛ «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»

- С 2017 ГОДА ВКЛЮЧЕН В МЕЖДУНАРОДНУЮ БАЗУ **SCOPUS®**

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

январь–март

2018, том 8

№ 1

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

Главный редактор

Тотоян Арег А. д.б.н., профессор, академик РАН, директор Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Мокроусов И.В. д.б.н., зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

- Апт А.С.** д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза, 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 ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
- Дозо Ч.** д.б.н., профессор, директор Национального научно-исследовательского центра — Институт имени Арманда Фраппьера, Квебек, Канада
- Лаврентьева И.Н.** д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Лобзин Ю.В.** д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
- Лоузири Э.** профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис
- Львов Д.К.** д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 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 Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
- Михайлов М.И.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, 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, первый заместитель председателя Комитета Государственной Думы по образованию и науке, 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, член-корреспондент РАН, научный руководитель ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
- Тотоян Артем А.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
- Фрейдлин И.С.** д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Института экспериментальной медицины, 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, научный руководитель Института иммунологии и физиологии, 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, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург, Россия
- Вишневский Б.И.** д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия
- Долгушин И.И.** д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, президент 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, 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 кишечных инфекций Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Кашкин К.П.** д.м.н., профессор, академик РАН, профессор кафедры иммунологии Российской медицинской академии последипломного образования МЗ 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, советник директора Центрального НИИ эпидемиологии, зав. отделом инфекционной патологии, Москва, Россия
- Нарвская О.В.** д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия
- Савичева А.М.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией микробиологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
- Сельков С.А.** д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунологии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия
- Тец В.В.** д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии 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 ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
- Чекнев С.Б.** д.м.н., зам. директора по научной работе ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 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.б.н. (Санкт-Петербург)

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

Учредители

Северо-Западное отделение медицинских наук
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.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77–64788 от 02 февраля 2016 г.

Электронная версия журнала: www.iimmun.ru и 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

С 2016 года включен в базу данных Russian Science Citation Index (RSCI), интегрированную с платформой Web of Science

С 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

С 2017 года журнал «Инфекция и иммунитет» включен в международную базу Scopus

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

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

Подписано в печать 22.03.2018 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 12,5.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1086

© Инфекция и иммунитет
© Северо-Западное отделение медицинских наук, 2018
© НИИЭМ имени Пастера, 2018
© СПб РО РААКИ, 2018

Russian Journal of Infection and Immunity

(Infektsiya i immunitet)

January–March

2018, volume 8

No. 1

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

Editor-in-chief

Areg A. Totolian PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy editor-in-chief

Igor V. Mokrousov PhD, MD (Biology), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Russian Federation

Members of editorial board

- Alexander S. Apt** PhD, MD (Biology), Professor, Central Research Institute of Tuberculosis, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Moscow, Russian Federation
- Luis Barbeito** PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Montevideo, Director, Montevideo, Uruguay
- Paul Brey** PhD, MD (Biology), Professor, Institute Pasteur du Laos, Director; Laboratory of Medical Entomology and Biology of Disease Vectors, Head, Vientiane, Laos
- Charles M. Dozois** PhD, MD (Biology), Professor, INRS — Institute Armand Frappier, Director, Quebec, Canada
- Alexander L. Gintsburg** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
- Irina N. Lavrentieva** PhD, MD (Medicine), St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg, Russian Federation
- Yuri V. Lobzin** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Director, St. Petersburg, Russian Federation
- Hechmi Louzir** Professor, Institute Pasteur de Tunis, Director, Tunis, Tunisia
- Dmitry K. Lvov** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, M.F. Gamaleya Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation
- Menelaos N. Manoussakis** Hellenic Pasteur Institute, Director, Athens, Greece
- Nikolai V. Medunitsyn** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russian Federation
- Michael I. Michailov** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis; Peoples' Friendship University of Russia, Head of the Department of Microbiology and Virology, Moscow, Russian Federation
- Hristo Najdenski** PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Stephan Angeloff, Director; Department of Infectious Microbiology, Head, Sofia, Bulgaria
- Gennadiy G. Onishchenko** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, First Deputy Chairman of the State Duma Committee on Education and Science, Moscow, Russian Federation
- Vadim V. Pokrovskiy** PhD, MD (Medicine), 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
- Andrei S. Simbirtsev** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Scientific Director on Science, St. Petersburg, Russian Federation
- Artem A. Totolian** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Irina S. Freidlin** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Institute of Experimental Medicine, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
- Rahim M. Khaitov** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology, Scientific Adviser, Moscow, Russian Federation
- Valery A. Chereshev** PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Institute of Immunology and Physiology, Scientific Director, Yekaterinburg, Russian Federation
- Andre Spiegel** PhD, MD (Medicine), Professor, Institute Pasteur de Dakar, Director, Dakar, Senegal

Members of editorial council

Vladimir A. Aleshkin	PhD, MD (Biology), Professor, G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Moscow, Russian Federation
Oleg V. Bukharin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthisiopulmonology, Head Researcher, Department of Laboratory Diagnostic, St. Petersburg, Russian Federation
Ilija I. Dolgushin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Chelyabinsk State Medical Academy, President, Moscow, Russian Federation
Vitaly V. Zverev	PhD, MD (Biology), 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 (Medicine), Professor, I.I. Mechnikov North-West State Medical University, Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, St. Petersburg, Russian Federation
Lidiia A. Kaftyreva	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Kirill P. Kashkin	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Professor of the Department of Immunology, Moscow, Russian Federation
Olga I. Kubar	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Leading Researcher, St. Petersburg, Russian Federation
Victor V. Maleev	PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Central Research Institute of Epidemiology, Adviser of the Director, Moscow, Russian Federation
Olga V. Narvskaya	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics, St. Petersburg, Leading Researcher, Russian Federation
Alevtina M. Savicheva	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Microbiology, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei A. Selkov	PhD, MD (Medicine), Professor, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Head of the Laboratory of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation
Viktor V. Tets	PhD, MD (Medicine), Professor, Pavlov State Medical University, Head of the Department of Microbiology and Virology, St. Petersburg, Russian Federation
Susanna M. Kharit	PhD, MD (Medicine), Professor, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Head of the Prevention Department of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation
Galina Ya. Tseneva	PhD, MD (Medicine), Professor, St. Petersburg Pasteur Institute, Head of the Laboratory of Bacterial Respiratory Infections, St. Petersburg, Russian Federation
Sergei B. Cheknev	PhD, MD (Medicine), N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Deputy Director on Science, Head of the Laboratory of Cellular Interactions, Moscow, Russian Federation
Vyacheslav V. Shkarin	PhD, MD (Medicine), 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 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

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media
Certificate of registration PI no. FS 77–64788 from February, 02, 2016

Electronic version: www.iimmun.ru and 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

Since 2016 included in Russian Science Citation Index (RSCI) database, integrated in Web of Science

Since 2016 the Russian Journal of Infection and Immunity is included in Web of Science (Emerging Sources Citation Index)

Since 2017 the Russian Journal of Infection and Immunity is included into international Scopus 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

Produced at the Beresta Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg, Koli Tomchaka str., 28.

Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 22.03.2018. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 12,5.

Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies).

© Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet

© North-West Regional Branch of Medical Sciences, 2018

© St. Petersburg Pasteur Institute, 2018

© SPb RAACI, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л.
НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ СТАРЫХ ДОГМ. ЧАСТЬ 2 7
- Продеев А.П., Устинова М.В., Корсунский А.А., Гончаров А.Г.
НОВЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА СЕПСИСА И СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА У ДЕТЕЙ. СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ 19

Оригинальные статьи

- Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Куц А.А.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГРИППА А ПОДТИПОВ Н1, Н5 И Н9 В МАКРОФАГАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ТНР-1 25
- Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Рябко А.К., Титарева Г.М., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С.
ОСОБЕННОСТИ β -ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПОДВИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА 33
- Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Лагурева А.В., Ляпун И.Н., Кондрашова Н.М., Огнева С.Д.
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФОНЕ ТЕПЛОВОГО СТРЕССА 43
- Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Тимофеева А.В.
МИКРОБНЫЙ СОЦИУМ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НИШИ: РОТОВАЯ ПОЛОСТЬ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ 54
- Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рощина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., Хамитова И.В., Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И.
ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ ИЗ СРЕДНЕЙ АЗИИ И ПОСТОЯННЫХ ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К НИМ 61
- Эсауленко Е.В., Сухорук А.А., Захаров К.А., Яковлев А.А.
ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ (pre-S1/pre-S2/S) 71

Краткие сообщения

- Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П.
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ 79
- Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Ракитина Е.Л., Афанасьев Е.Н., Костюченко М.В.
ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕСТИНА ПП И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO* 85

История науки

- Тотолян Артем А.
«УЧИТЕЛЬ! ПЕРЕД ИМЕНЕМ ТВОИМ...» (к 120-летию со дня рождения В.И. Иоффе) 91

Правила для авторов 97

Авторский указатель 100

Предметный указатель 100

CONTENTS

Reviews

- Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtatidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L.*
THE NEW LOOK AT NEUTROPHILIC GRANULOCYTES: RETHINKING OLD DOGMAS. PART 2 7
- Prodeus A.P., Ustinova M.V., Korsunskiy A.A., Goncharov A.G.*
NEW ASPECTS OF SEPSIS AND SEPTIC SHOCK PATHOGENESIS IN CHILDREN. THE COMPLEMENT SYSTEM AS TARGET FOR AN EFFECTIVE THERAPY 19

Original articles

- Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Masalova O.V., Kushch A.A.*
COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE DEVELOPMENT OF INFLUENZA INFECTION IN MACROPHAGES DIFFERENTIATED FROM MONOCYTES OF THP-1 (INFLUENZA A VIRUSES OF SUBTYPES H1, H5 AND H9) 25
- Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., Titareva G.M., Lev I.O., Mokrievich A.N., Timofeev V.S.*
FEATURES OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY IN *FRANCISELLA TULARENSIS* subsp. *MEDIASIATICA* 33
- Plekhova N.G., Somova L.M., Drobot E.I., Lagureva A.V., Lyapun I.N., Kondrashova N.M., Ogneva S.D.*
THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS IN BACTERIAL INFECTION ON BACKGROUND OF THERMAL STRESS 43
- Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Timofeeva A.V.*
SOCIETY OF ENVIRONMENTAL NICHE: ORAL CAVITY OF THE HEALTHY CHILDREN 54
- Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Yu., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bespalova G.I.*
INFECTION OF LABOUR MIGRANTS FROM CENTRAL ASIA AND RESIDENTS OF ST. PETERSBURG AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO VARIOUS INFECTIOUS DISEASES 61
- Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Zakharov K.A., Yakovlev A.A.*
IMMUNOGENICITY OF THE THIRD GENERATION HEPATITIS B VACCINE (pre-S1/pre-S2/S) 71

Short communications

- Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P.*
SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED IN A MULTIDISCIPLINARY MEDICAL CENTRE 79
- Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V.*
OPTIMIZATION OF THE METHOD OF OBTAINING PESTINE PP AND STUDYING ITS SPECIFIC ACTIVITY *IN VITRO* 85

Science history

- Totolian Artem A.*
“THE TEACHER! BEFORE YOUR NAME...” (to the 120th anniversary of Vladimir Ilyich Ioffe) 91

Instructions to Authors 97

Author index 100

Subject index 100

НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА НЕЙТРОФИЛЬНЫЕ ГРАНУЛОЦИТЫ: ПЕРЕОСМЫСЛЕНИЕ СТАРЫХ ДОГМ. ЧАСТЬ 2*

И.В. Нестерова^{1,2}, Н.В. Колесникова², Г.А. Чудилова², Л.В. Ломтатидзе²,
С.В. Ковалева², А.А. Евглевский², Т.З.Л. Нгуен¹

¹ ФГАБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Краснодар, Россия

Резюме. Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты (НГ) являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний. НГ обладают мощным рецепторным репертуаром, обеспечивающим связь между собой и клетками иммунной системы, а также связь с клетками эндотелия, эпителия и других тканей. Индуцирующие стимулы активируют НГ и способствуют транслокации из цитоплазматических гранул и везикул молекул на поверхностную цитоплазматическую мембрану, секретируют широкий спектр про- и противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, колониестимулирующих, ангиогенных и фиброгенных факторов, членов TNF суперсемейства, хемокинов, регуляторных белков и т. д. Хроматин ядер НГ способен к реструктуризации под влиянием индуцирующих стимулов, что сопряжено с экспрессией многочисленных генов цитокинов. НГ, получающие комплексные цитокиновые влияния не только приобретают новые черты, но и проходят различные стадии активации и дифференцировки, участвуют как в процессах внутриклеточной интрафагосомальной дегрануляции, осуществляя киллинг и элиминацию фагоцитированных микроорганизмов, так и внеклеточной дегрануляции при формировании нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (NET), при этом погибая через NETosis. Особенности фенотипа НГ и их функциональных свойств демонстрируют наличие субпопуляций НГ с различными возможностями: разной рецепторной оснащенностью, способностью реструктуризировать хроматин, экспрессировать гены цитокинов и секретировать цитокины, реализовывать содержимое гранулярного аппарата, продуцировать активные формы кислорода, осуществлять цитотоксичность, образовывать NET. По нашему мнению, можно выделить субпопуляции НГ: регуляторные; супрессорные; провоспалительные — инициирующие воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом — «агрессивные»; противовоспалительные — регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые — TAN1; проопухолевые — TAN2; гибридные, сочетающие свойства НГ и дендритных клеток. Отсутствие адекватного реагирования, гиперактивация или блокада функций НГ приводит к развитию вялотекущих инфекционно-воспалительных заболеваний, не отвечающих на традиционную терапию, аутоиммунных/хронических заболеваний иммунозависимых процессов. Ремоделирование дисфункций НГ — ключ к новой иммунотерапевтической стратегии.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, иммунофенотип, микробицидность, реструктуризация хроматина, экстрацеллюлярные сети, цитокинопродукция.

* Часть 1 опубликована в № 3 журнала «Инфекция и иммунитет» за 2017 г.

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123-1.
Тел.: 8 916 187-73-41 (моб.).
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Contacts:

Irina V. Nesterova
117513, Russian Federation, Moscow, Leninsky pr., 123-1.
Phone: +7 916 187-73-41 (mobile).
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Библиографическое описание:

Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18

© Нестерова И.В. и соавт., 2018

Citation:

Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadize L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 7–18. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2018-1-7-18>

THE NEW LOOK AT NEUTROPHILIC GRANULOCYTES: RETHINKING OLD DOGMAS. PART 2Nesterova I.V.^{a,b}, Kolesnikova N.V.^b, Chudilova G.A.^b, Lomtadidze L.V.^b, Kovaleva S.V.^b, Evglevsky A.A.^b, Nguyen T.D.L.^a^a Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation^b Kuban State Medical University of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Numerous modern basic research done undeniable fact that neutrophilic granulocytes (NG) are key effector and regulatory circuits both innate and adaptive immunity, and play a crucial role in the pathogenesis of a wide range of diseases. NG have potent receptor repertoire, providing a connection between them, cells of the immune system, as well as communication with endothelial cells, epithelial and other tissues. NG inducing stimuli activate and promote the translocation of cytoplasmic granules and vesicles surface molecules on the cytoplasmic membrane the secretion of a large spectrum of pro- and anti-inflammatory, immunoregulatory cytokines, colony, angiogenic factors and fibrogenic, TNF superfamily members, chemokines, regulatory protein, etc. Chromatin nuclei NG capable of restructuring under the influence of inducing stimuli, which is associated with the expression of multiple cytokine genes. NG receiving complex cytokine influence not only acquire new features, but also in various stages of activation and differentiation processes involved in intracellular intraphagosomal degranulation and killing of implementing elimination microorganisms and extracellular neutrophil degranulation in the formation neutrophil extracellular traps (NET), while this dying through NETosis. Features NG phenotype and their functional properties, demonstrate the existence of subpopulations of NG with different capabilities: equipment of different receptor, the ability to restructure chromatin expressing cytokine genes and secrete cytokines to implement the contents of the granular system, produce reactive oxygen species, implement cytotoxicity form NET. In our opinion, there subpopulation NG: regulatory; suppressor; proinflammatory — initiating an inflammatory response; inflammation with a positive potential microbicidal (antibacterial, antiviral, antifungal); inflammatory cytotoxic potential of the negative — «aggressive»; anti-inflammation regulating regression; antitumoral — TAN1; pro-tumoral — TAN2; hybrid, combining the characteristics of NG and dendritic cells. The absence of adequate response, or hyperactivation blockade NG functions leads to the development of low-intensity infectious and inflammatory diseases, do not respond to conventional therapy of autoimmune diseases/chronic immune-dependent processes. Remodeling dysfunctions NG — the key to new immunotherapeutic strategies.

Key words: neutrophil granulocytes, immunophenotype, microbicide, extracellular traps, restructuring chromatin, cytokine production

Регуляторные влияния нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) пластичны и способны, в зависимости от условий, менять свой фенотип и приобретать новые функции. НГ регулируют функции клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, оказывая на них как активирующие, так и супрессирующие влияния в зависимости от сценария иммунного ответа.

Осуществляя первую линию клеточной защиты, НГ регулируют функциональную активность другого класса фагоцитов — моноцитов/макрофагов, как повышая их противомикробную активность [46], так и вызывая супрессивные изменения, опосредуемые цитоплазматическим белком гранулоцитов S100A9 в процессе фагоцитоза макрофагами апоптотических НГ [24]. Сам макрофагальный фагоцитоз апоптотических НГ может регулироваться локально как про-, так и противовоспалительными факторами [30]. При этом, НГ осуществляют регуляторные влияния как на клетки врожденного иммунитета, так и на участников адаптивного иммунитета, что соответствует представлениям Janeway С.А. и соавт. о реакциях врожденного иммунитета не только как о необходимом фоне для активации адаптивного ответа, но и для формирова-

ния Т-клеточного ответа [32]. В частности, известно, что при дегрануляции активированных НГ на клеточную поверхность и во внеклеточное пространство высвобождаются сериновые лейкоцитарные протеазы, которые регулируют взаимодействие систем врожденного и адаптивного иммунитета путем модуляции экспрессии и активности клеточных рецепторов и цитокинов, продуцируемых различными клетками [7]. Выявлены механизмы супрессорного влияния некоторых субпопуляций НГ на пролиферацию Т-клеток, опосредованные секрецией внеклеточной аргиназы и внеклеточных активных форм кислорода (АФК), посредством образования иммунологических синапсов, через которые непосредственно к поверхности лимфоцитов доставляются АФК [44]. Таким образом, являясь уникальной мультипотентной популяцией клеток, НГ обладают очень важными функциональными возможностями, способствующими полноценной реализации иммунного ответа [18, 36, 48, 47] (рис. 1).

Устаревшее представление о НГ исключительно как о клетках антимикробной резистентности не отражает всех данных об их функциональных возможностях. В последние годы получены данные об усилении секреции нейтрофильных дефенсинов RtNP-3 в плазму крови в условиях стресса, что может свидетельствовать о вовлеченности последних в ход развертывания

стресс-реакции [1]. Известно также, что участие НГ в антиэндотоксиновой защите имеет большое значение как в реализации патофизиологических эффектов синдрома эндогенной интоксикации, так и в ходе развития инфекционного процесса, во многом определяя степень тяжести и прогноз заболевания в целом. В отсутствие инфекционного патогена, но при встрече с опухолевыми клетками НГ активируются и погибают, образуя сети из нитей ДНК (нейтрофильные ловушки), которые ограничивают периферическое распространение опухолевых клеток [4]. Распределение ролей в реализации противоопухолевой защиты зависит от цитокинового окружения и реализуется через механизмы как прямой, так и не прямой цитотоксичности [12]. Последние достижения в области изучения НГ иллюстрируют высокую степень пластичности и функциональную гетерогенность популяции НГ в зависимости от течения физиологических и патологических сценариев иммунного ответа. Fridlender Z.G. и соавт. [31] показали, что существует две различных субпопуляции опухолеассоциированных НГ (tumor-associated neutrophils — TANs) с противоопухолевой (N1) и проопухолевой (N2) активностями.

Нейтрофильные гранулоциты при инфекционных заболеваниях

Дефектно функционирующие НГ [дефицит количества НГ, нарушение фагоцитарной функции, дефицит миелопероксидазы, дефенсинов, лактоферрина, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, NADPH-оксидазы и т. д., дефекты формирования нейтрофильных экстрацеллюлярных сетей (neutrophil extracellular traps — NET)] не обеспечивают адекватную противомикробную защиту, что приводит к развитию сепсиса, рецидивирующих гнойных инфекций, хронических бактериальных инфекций и т. д. Отсутствие адекватного реагирования или блокада функций НГ в ответ на микробную агрессию может приводить к развитию вялотекущих хронических инфекционно-воспалительных заболеваний (ИВЗ), не отвечающих на традиционную терапию. В то же время гиперактивация НГ сопровождается многими аутоиммунными заболеваниями/хронические иммунозависимые процессы и напрямую связана с гиперпродукцией некоторых цитокинов, например IL-17 (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, васкулит Вегенера и т. д.). Гиперпродукция IL-8 клетками желудочного эпителия, провоцируемая *H. pylori* при хеликобактерном гастрите, привлекает НГ в зону воспаления, обеспечивая тем самым нетипичный воспалительный процесс: при хроническом воспалении ведущим субстратом становятся НГ, которые традиционно считают участниками только острого бактериального

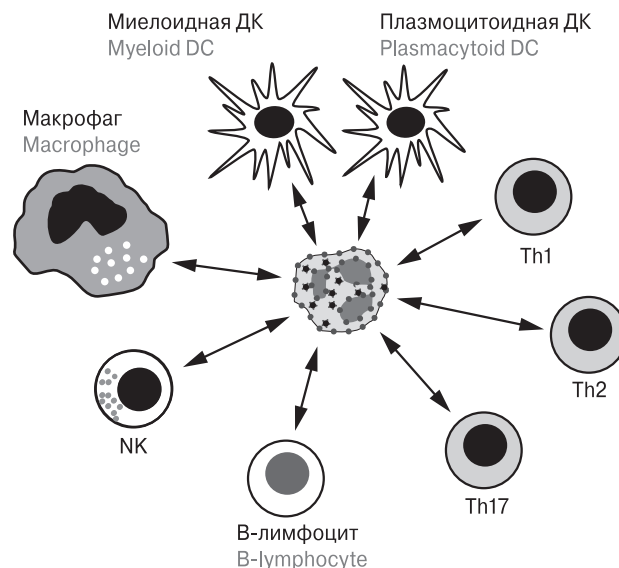


Рисунок 1. Взаимные регуляторные влияния нейтрофильных гранулоцитов и других клеток иммунной системы

Figure 1. Mutual regulatory effects of neutrophilic granulocytes and other cells of the immune system

воспаления. Кроме того, *H. pylori* активируют NADPH-оксидазы к продукции реактивных кислородных метаболитов путем транслокации их цитозольной субстанции на плазматическую мембрану НГ, что повреждающе влияет на окружающие ткани, провоцируя формирование эрозий и/или язв желудка.

В настоящее время описаны дисфункции НГ, которые при различных ИВЗ с нетипичным течением могут протекать по разному сценарию и манифестировать как гиподисфункцией на фоне дефицита НГ при рецидивирующих и упорно рецидивирующих гнойных процессах, хронических ИВЗ вирусно-бактериальной этиологии, не поддающихся стандартному лечению, так и блокадой функциональной активности: развитием неадекватного ответа вплоть до состояния неотвечаемости при хронических вялотекущих инфекционно-воспалительных процессах с затяжным течением обострений, социально значимых инфекциях, при сепсисе, или гиперэргическим функционированием (внеклеточная продукция кислородных радикалов в высокой концентрации, например), которое может приводить к супрессии Т-звена иммунной системы (ИС), повреждению органов и тканей при хронических иммунозависимых заболеваниях или септическом шоке [25, 33, 49]. Нетипично протекающие ИВЗ на фоне расстройств ИС и, в частности, на фоне дисфункций НГ, приводят к повышенной заболеваемости, частичной, а иногда и полной, потере трудоспособности, высокой летальности при сепсисе как у взрослых субъектов, так и у детей, особенно в периоде новорожденности [8, 21]. Неонатальные НГ

характеризуются количественным и качественным дефицитом по сравнению с НГ взрослого человека. Неонатальный сепсис — проблема глобального масштаба, поскольку имеет самые тяжелые последствия и характеризуется высокой летальностью. Это происходит на фоне нарушений функционирования ИС и дефектных НГ, что способствует быстрому диссеминированию инфекции и, как следствие — смерти новорожденного [51]. Так, описаны три важных нарушения НГ, которые способствуют возникновению тяжелого неонатального сепсиса и септического шока: нейтропения, сниженная пластичность и запоздалый апоптоз [37]. При сепсисе и синдроме системной воспалительной реакции (ССВР) в циркуляции появляется большое количество незрелых форм НГ. Они характеризуются снижением фагоцитарной функциональной активности, пониженной продукцией АФК, дефектным уровнем экспрессии рецепторов CD14 MD-2, нарушением миграционной способности. Незрелые НГ характеризует высокий базальный уровень соотношения внутриклеточных TNF α /IL-10, подтверждающий их провоспалительный фенотип. Они имеют более длинный жизненный цикл, резистентны к спонтанному апоптозу и могут созреть *ex vivo* [27]. Пациенты с сепсисом (более тяжелая воспалительная реакция) имеют более выраженное снижение некоторых рецепторов, в частности TREM-1, который играет ключевую роль в амплификации продукции воспалительных цитокинов, чем пациенты, страдающие неинфекционным синдромом системной воспалительной реакции [41].

Нейтрофильные гранулоциты в противовирусной защите

НГ, являясь основной эффекторной частью ИС, способны не только уничтожать патогены, но и регулировать иммунный ответ и воспаление, в том числе и при вирусной инфекции [16, 45]. НГ влияют на адаптивный иммунный ответ при вирусной инфекции [28, 42] путем презентации антигена, транслокации патогенных вирусов в лимфатические узлы, супрессорной модуляции ответа Т-клеток, экспрессии Toll-подобных рецепторов, распознающих ДНК вируса герпеса (TLR-9) [2, 20, 42]. НГ представляют собой важные элементы противовирусного иммунитета, реализуя свои возможности посредством процесса фагоцитоза, образования активных форм кислорода (АФК), формирования NET, способности синтезировать и секретировать цитокины, дефенсины, интерфероны [5, 3, 9, 16, 19]. Исследования последних лет показали, что, с одной стороны, НГ способны осуществлять противовирусную защиту, с другой стороны — многие вирусы, в частности, герпесвирусы, способны негативно влиять на функции НГ, трансформировать их

фенотип и влиять на формирование популяций/субпопуляций с различными функциональными свойствами [45]. Герпесвирусы могут усиливать апоптоз НГ, что приводит к возникновению нейтропении, блокировать противовирусную активность НГ и т. д.

Повреждение НГ герпесвирусами нарушает их функционирование и приводит в совокупности с другими факторами к срыву адапционных реакций [16, 19, 20, 26, 45]. В последние годы показано, что при хронической герпесвирусной инфекции имеются многочисленные субпопуляции НГ, характеризующиеся различными фенотипами с различной рецепторной оснащенностью, обладающие различными функциональными свойствами: способностью реструктуризировать хроматин, экспрессировать гены цитокинов и секретировать цитокины, реализовывать активность гранулярного аппарата, продуцировать активные формы кислорода, осуществлять цитотоксичность, образовывать NET.

Фенотипический профиль и функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов при инфекционно-воспалительных заболеваниях

Большой вклад в изучение клеточных взаимодействий физиологической и патогенетической значимости НГ в этом свете вносит изучение рецепторов НГ. Изучение субпопуляций НГ представляет новый подход к определению функциональной активности НГ, позволяющий оценить адекватность включения НГ в реализацию иммунного ответа, а также диагностировать и прогнозировать исход заболевания. Известно, что различные фенотипические профили и уровень оснащенности поверхностными рецепторами связаны с морфологическими особенностями и определяют функциональный потенциал НГ — цитокинопродукцию, трансэндотелиальную миграцию, внутриклеточный и внеклеточный киллинг, образование NET [10, 13, 22]. Продемонстрировано существование достаточно большого количества субпопуляций НГ, обладающих различными возможностями. НГ, получающие комплексные цитокиновые влияния, не только приобретают новые черты, но и проходят различные стадии активации и дифференцировки, экспрессируя при этом антигены МНС II класса, CD80, CD86, ICAM-1, LFA-1 [10, 12, 44]. Доказано, что индуцирующие цитокиновые стимулы дифференцируют НГ в уникальную гибридную популяцию с дуальными фенотипическими и функциональными свойствами характерными как для НГ, так и дендритных клеток (ДК), участвующую во врожденной и адаптивной иммунной реакции [38].

В наших более ранних работах были выделены следующие субпопуляции НГ: регуляторные; супрессорные; провоспалительные — иницирующие воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом — «агрессивные»; противовоспалительные — регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые — TAN1; проопухолевые — TAN2, гибридные [16].

Фагоцитарная и микробицидная функция, вирусоцидная активность НГ находится в непосредственной зависимости от фенотипических особенностей: количества и плотности таких экспрессируемых рецепторов, как CD11b/CD18, CD10, CD15, CD16, CD32, CD64, CD35 и т. д. [29]. Экспрессия на мембране НГ CD32, CD16 важна в осуществлении фагоцитарной функции и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), которая ассоциируется с CD11b/CD18-зависимым повышением адгезии, дегрануляцией и киллингом [39]. CD64, CD32, CD16 — триггерные молекулы, запускающие иммунный фагоцитоз и процессы киллинга [14] (рис. 2).

Большую диагностическую и прогностическую значимость имеют выявленные нами варианты ремоделирования фенотипа НГ, одновременно экспрессирующих CD64, CD32, CD11b и CD16 функционально значимые рецепторы, при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в том числе у новорожденных различного гестационного возраста [14], у пациентов с неопластическими процессами [11, 12], у женщин репродуктивного возраста с генитальными и экстрагенитальными инфекционно-воспалительными заболеваниями (ИВЗ) [6].

При изучении вариативности одновременной презентации на мембране НГ рецепторов CD64, CD32, CD16, CD11b установлено, что у здоровых взрослых и детей разного возраста в периферической крови присутствуют одна мажорная субпопуляция CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ и 5 минорных субпопуляций НГ: CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁻, CD64⁻CD32⁻CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁻, CD64⁺CD32⁻CD16⁺CD11b⁺ с различной оснащенностью и плотностью изучаемых рецепторов. При патологических состояниях происходит трансформация фенотипа НГ и регистрируются изменения как качественных, так и количественных характеристик субпопуляций НГ (табл.).

При ИВЗ бактериальной этиологии у новорожденных (врожденная пневмония, неонатальный сепсис) нами выявлено значительное увеличение субпопуляции НГ с фенотипом CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ с высокой плотностью экспрессии CD11b и CD16. Наблюдаемое увеличение указанной субпопуляции НГ в периферической крови находится в прямой зависи-

мости от тяжести инфекционно-воспалительного процесса: чем клинически тяжелее протекает заболевание, тем большее количество НГ с этим фенотипом CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ находится в циркуляции [15].

При наличии генитальных и экстрагенитальных ИВЗ у женщин фертильного возраста, планирующих беременность, так же выявлена фенотипическая вариативность НГ — появление субпопуляции CD16⁺CD32⁺CD11b⁻, что свидетельствует о стойком нарушении их рецепторной функции и необходимости ее адекватной коррекции, заключающейся в восстановлении фенотипического состава НГ. Так, проведение предгравидарной подготовки с включением иммунотерапии оказывает позитивный клинико-иммунологический эффект, заключающийся в нормализации рецепторной функции НГ, коррелирующей с увеличением процента забеременевших женщин [6]. Полученные нами данные позволяют разрабатывать критерии контроля за течением ассоциированных вирусных инфекций и бактериальных гнойно-воспалительных заболеваний, диагностировать и/или прогнозировать усугубление их тяжести, оптимизировать методы иммунотерапии, направленные на коррекцию дисфункций НГ.

Многokратное увеличение субпопуляции CD64⁻CD32⁻CD16⁺CD11b⁺ НГ было показано у детей с повторными острыми респираторными вирусными инфекциями, ассоциированными с герпесвирусной моно- или микстинфекциями. При этом наблюдалась значительная репликативная активность таких герпесвирусов, как ВПГ I/II, ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ VI [15, 40].

Для полноценного функционирования НГ важны не только определенный субпопуляционный состав, но и адекватный уровень плотности экспрессии соответствующих поверхностных мембранных маркеров НГ. Так, Pillay J. с соавт. обнаружили несколько субпопуляций НГ с различным фенотипом, которые отличались по количеству и плотности оснащения рецепторами: зрелые НГ — с фенотипом CD16^{high}CD62L^{high}, незрелые НГ — с фенотипом CD16^{low}CD62L^{high}, супрессорные НГ — с фенотипом CD16^{high}CD62L^{low} и НГ-предшественники — с фенотипом CD16^{low}CD62L^{low} [42]. Субпопуляция циркулирующих НГ с фенотипом CD16^{low}CD62L^{high} наблюдалась у детей с респираторно-синцитиальной вирусной инфекцией, а также при вирусной и бактериальной коинфекции [23, 35]. Показано, что субпопуляция незрелых НГ не обладала способностью к иммунной защите от микроорганизмов. У пациентов с ВИЧ-инфекцией обнаружены активированные зрелые НГ с иммуносупрессивными свойствами [45].

Супрессорные НГ могут вызвать паралич ИС, в результате которого нарушается противоинфекционная защита, что облегчает возникновение бактериальных осложнений и вирусной

и бактериальной коинфекции [23, 34]. Появление $CD16^{high}CD62L^{low}$ НГ значительно возрастает при бактериальной инфекции или вирусной и бактериальной коинфекции и, в то же время, при вирусной инфекции с поражением нижних дыхательных путей эта субпопуляция практически не обнаруживается [23, 43]. У детей с тяжелой вирусной респираторной инфекцией без бактериальной коинфекции и у пациентов с бактериальным сепсисом была обнаружена нейтрофильная субпопуляция, характеризующаяся фенотипом $CD16^{low}CD62L^{low}$ [23, 35]. С помощью проточной цитометрии в сочетании с визуальной оценкой клеток было показано, что в эту субпопуляцию входит большое количество миелоцитов и метамиелоцитов, поэтому НГ с фенотипом $CD16^{low}CD62L^{low}$ назвали субпопуляцией НГ-«предшественников». Последовательное увеличение числа НГ-«предшественников» было статистически достоверным ($p < 0,001$) и не зависело от наличия бактериальной коинфекции [23]. Предположили, что НГ-«предшественники» происходят из гетерогенного семейства G-MDSCs (granulocyte myeloid-derived suppressor cells — гранулоцитарных супрессорных клеток миелоидного происхождения), к которым относятся гранулоцитарные клетки со свойством иммунного ингибирования [23, 44]. Достовер-

ных различий по количеству маркеров активации и дегрануляции $CD11b$, $CD54$, $CD63$, $CD66b$ у вышеуказанных четырех субпопуляций (зрелые НГ, незрелые НГ, супрессорные НГ и НГ-«предшественники») при вирусных инфекциях и при бактериальных коинфекциях у новорожденных с тяжелой вирусной инфекцией практически не выявлено. При этом отмечено, что при активации и дегрануляции у супрессорных НГ выявляется высокий уровень экспрессии $CD11b$ и $CD63$, в то время как у НГ-«предшественников» отмечается наиболее высокий уровень экспрессии $CD63$ и $CD66b$ и низкий уровень экспрессии $CD11b$ и $CD54$ [23]. Интересно, что количество НГ, находящихся в кровотоке и оснащенных $CD62L$ на поверхностной мембране, больше, чем $CD62L$ НГ, полученных из смывов бронхоальвеолярного лаважа, что предположительно связано с утратой этого рецептора при миграции.

В результате проведенных нами исследований у пациентов с острыми вирусными (острой вирусной Эпштейн–Барр (ВЭБ) инфекцией) и острыми бактериальными инфекционно-воспалительными заболеваниями (острым бактериальным тонзиллитом) были выявлены разные фенотипы НГ с индивидуальными характеристиками. Ранее было показано, что популяция $CD16^+CD11b^+$ НГ играет важную роль в осу-

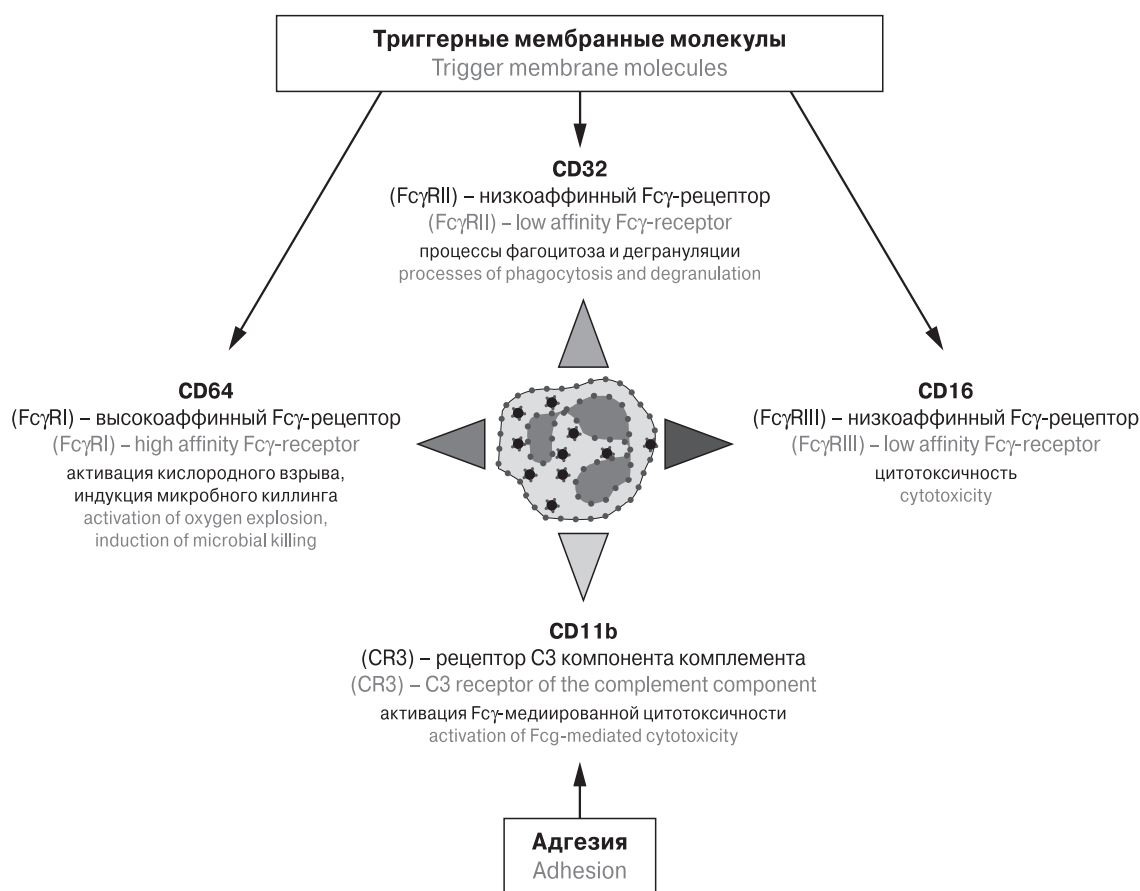


Рисунок 2. Функционально значимые рецепторы в субпопуляциях нейтрофильных гранулоцитов
Figure 2. Functionally significant receptors in subpopulations of neutrophilic granulocytes

Таблица. Фенотип субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов и их диагностическая значимость (Нестерова И.В. и соавт., 2010–2016)

Table. The phenotype of subpopulations of neutrophilic granulocytes and their diagnostic significance (Nesterova I.V. et al., 2010–2016)

Модель Model	Субпопуляция Subpopulation	Демонстрация/Функции Demonstration/Functions	Диагностическая значимость Diagnostic significance
Здоровые взрослые и дети [13, 14, 16, 17] Healthy adults and children	CD64⁻CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ CD16^{bright}CD11b^{dim}	– нормальные НГ (мажорные субпопуляции) – полноценное осуществление АЗКЦ, микробицидной активности – normal NG (major subpopulations) – full implementation of ADCC, microbicidal activity	– противовоспалительный и противоопухолевый эффект – anti-inflammatory and antitumor effect
Гнойно-септические заболевания у детей и взрослых [13, 14, 16, 17] Purulent-septic diseases in children and adults	CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺	– нормальные НГ (минорная субпопуляция у здоровых) – активированные НГ <i>in vivo</i> бактериальными антигенами (значительное увеличение в циркуляции) – normal NG (minor subpopulation in healthy) – activated NG <i>in vivo</i> by bacterial antigens (significant increase in circulation)	– маркер тяжести и прогрессирования бактериального процесса – marker of the severity and progression of the bacterial process
Острая бактериальная инфекция у взрослых [17] Acute bacterial infection in adults	CD16^{dim}CD11b^{bright}	– мажорная субпопуляция (значительное увеличение в циркуляции) – major subpopulation (significant increase in circulation)	– маркер остроты бактериального процесса – marker of acute of the bacterial process
Респираторные и герпесвирусные инфекции у детей [15, 16] Respiratory and herpes infections in children	CD64⁻CD16⁺CD32⁻CD11b⁺	– минорная субпопуляция НГ здоровых – значительное увеличение при вирусной респираторной и герпетической инфекции – депрессия фагоцитарной и микробицидной активности НГ – minor subpopulation NG in healthy – significant increase at viral respiratory and herpetic infection – depression of phagocytic and microbicidal activity of NG	– прогностический признак неблагоприятного течения вирусной инфекции – prognostic sign of adverse course of viral infection
Острая ВЭБ-инфекция у взрослых [17] Acute adult EBV infection in adults	CD16^{bright}CD11b^{bright}	– мажорная субпопуляция (значительное увеличение в циркуляции) – высокий уровень АЗКЦ и АФК-зависимая ингибция пролиферации Т-клеток [44] – major subpopulation (significant increase in circulation) – high level of ADCC and ROS-dependent inhibition of the proliferation of T-cells [44]	– маркер остроты вирусного процесса – прогностически неблагоприятный признак присоединения бактериальной инфекции – marker of the severity of the viral process; – prognostically unfavorable sign of bacterial infection

шествлении реакций фагоцитоза и АЗКЦ при инфекционных процессах различной природы. Известно, что CD11b и CD16 НГ — важнейшие триггеры, запускающие каскад активационных и регуляторных процессов НГ и у покоящихся неактивированных НГ CD11b и CD16 экспрессируются на низком уровне, а при активации клетки происходит дополнительная транслокация внутриклеточных CD16 и CD11b на мембрану НГ [17, 20, 29]. Наши исследования показали, что субпопуляция CD16^{bright}CD11b^{dim} НГ преобладала у здоровых людей, а НГ с фенотипом CD16^{bright}CD11b^{bright} отсутствовала у здоровых добровольцев, но появилась и доминировала при острой ВЭБ-инфекции (табл.) [17].

Pillay J. и соавт. [43, 44] обнаружили существование новой субпопуляции CD11c^{bright}CD62L^{dim}CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ — зрелых гиперсегментированных НГ человека с иммуносупрессивной активностью. Эта субпопуляция была способна подавлять пролиферацию Т-клеток через высвобождение активных форм кислорода и демонстрировала высокую экспрессию CD11b. Более ранние исследования Woodfin A. и соавт. продемонстрировали, что супрессивные НГ — зрелые НГ с гиперсегментированным ядром, экспрессирующие высокие уровни ICAM-1, обладают способностью к обратной трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) [50]. Позже Cortjens B. и его коллеги в 2017 г. [23] показали, что при тяжелой респираторной вирусной инфекции у младенцев экспрессия активационного маркера CD11b была значительно повышена у супрессорной субпопуляции НГ. Эти супрессорные субпопуляции НГ, появившиеся при вирусных и бактериальных коинфекциях у новорожденных, также имели самую высокую экспрессию молекул CD63 на их поверхностных мембранах, что свидетельствовало об активной дегрануляции НГ.

Выявленное нами при острой бактериальной инфекции (острый бактериальный тонзиллит) появление превалирующей популяции CD16^{dim}CD11b^{bright} НГ свидетельствовало, по нашему мнению, о выходе в циркуляцию незрелых форм НГ при бактериальной атаке. В то же время при острой вирусной инфекции (острой ВЭБ-инфекции) преобладала субпопуляция CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ. Мы предположили, что с одной стороны, появление CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ с высокой цитотоксичностью (высокие уровни экспрессии CD16) и с супрессивным влиянием на пролиферацию Т-клеток (высокие уровни экспрессии молекул CD11b) необходимо для реализации противовирусной активности НГ в их борьбе с ВЭБ-инфекцией. CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ должны обладать высокой противовирусной активностью. С другой стороны, их супрессорные свойства (высокие уровни экспрессии CD11b), возможно, приведут к различным осложнениям в виде вторичных бактериальных инфекций. Таким образом, при тяжелой острой

ВЭБ-инфекции выявлено ремоделирование фенотипа НГ и появление новой субпопуляции CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ с высокой цитотоксичностью и супрессивным влиянием. Необходимы дальнейшие исследования для выявления функциональной значимости субпопуляции CD16^{bright}CD11b^{bright} НГ как при ВЭБ-инфекции, так и при других герпесвирусных инфекциях, а также для изыскания возможности иммуномодулирующих воздействий на этот «негативный» фенотип НГ с целью его позитивной трансформации, что позволит предотвратить присоединение тяжелых бактериальных осложнений [17].

В связи с изложенным насущной задачей фундаментальной иммунологии является изучение различных вариантов дисфункций НГ с уточнением особенностей спонтанной и индуцированной реструктуризации ядерного хроматина, трансформации фенотипа различных субпопуляций и функциональной активности НГ при нетипично протекающих ИВЗ, и на этой основе необходим поиск методов, направленных на улучшение функционирования дефектных НГ. Разработка экспериментальных подходов к созданию методов ремоделирования дефектно функционирующих НГ при различных нетипично протекающих инфекционно-воспалительных процессах в настоящее время является актуальнейшей проблемой и требует своевременного решения.

Заключение

Таким образом, классический взгляд на НГ как на короткоживущие кончнодифференцированные эффекторные клетки воспалительной реакции, осуществляющие только фагоцитоз, киллинг и элиминацию внеклеточных патогенов, убедительно опровергнут каскадом последних исследований. Новые научные факты, полученные в течение лишь последних 10–15 лет, продемонстрировали, что НГ обладают определенными регулирующими влияниями как активирующего, модулирующего, так и депрессивного характера практически на все клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Более того, доказано, что длительность жизненного цикла НГ может значительно увеличиваться под влиянием комплексного воздействия цитокинов, в том числе при выполнении «своих обязанностей» в крови и тканях при защите от агрессивных микробных патогенов, различных АГ, неопластических и мутировавших клеток. НГ способны под влиянием индуцировавших стимулов повышать экспрессию генов, кодирующих ключевые медиаторы воспаления, в том числе компоненты комплемента, Fc-рецепторы, хемокины и провоспалительные, противовоспалительные и регуляторные цитокины. При этом существуют данные, свидетельствующие о том, что НГ продуцируют и различные противовос-

палительные факторы, в том числе липоксины, которые способствуют разрешению воспаления. Более того, показано, что при катастрофическом состоянии иммунной системы при сепсисе тканевые НГ, получив определенную информацию, способны к реверсивной трансмиграции не только в периферическую кровь, но и в костный мозг и, таким образом, способны влиять на процессы созревания клеток иммунной системы и приобретение ими определенных функций. Развитие новых диагностических технологий позволило расширить и углубить наше понимание роли НГ в иммунном гомеостазе и оценить динамическую взаимосвязь функционального потенциала клетки с ее генной экспрессией и синтезом тех или иных факторов, участвующих в иммунологическом «кросс токе» (перекрестном разговоре), и фенотипической поляризации НГ в ответ на индуцирующие сигналы интра- и экстрацеллюлярного окружения. До настоящего времени еще окончательно неизвестно сколько имеется фенотипов НГ. По нашему мнению, существует несколько субпопуляций НГ с различной рецепторной оснащённостью, отличающиеся по своим свойствам реструктуризировать хроматин, экспрессировать гены цитокинов и секретировать про- и противовоспалительные цитокины, реализовывать содержимое гранулярного аппарата, продуцировать активные формы кислорода, осуществлять цитотоксичность, образовывать NET. Так, можно выделить следующие субпопуляции НГ: регуляторные; супрессорные; провоспалительные — инициирующие

воспалительную реакцию; воспалительные с позитивным микробицидным потенциалом (антибактериальным, противовирусным, противогрибковым); воспалительные с негативным цитотоксическим потенциалом — «агрессивные»; противовоспалительные — регулирующие регрессию воспаления; противоопухолевые — TAN1; проопухолевые — TAN2; гибридные, сочетающие свойства НГ и ДК.

Многочисленные современные фундаментальные и клинические исследования убедительно демонстрируют, что пришло время переосмысления старых догм: неоспоримые факты свидетельствуют о том, что НГ являются ключевыми эффекторными и регуляторными мультифункциональными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, а различные дисфункции НГ играют негативную, часто решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний: количественный и функциональный дефицит, неадекватность ответа на микробные патогены и антигены некоторых опухолей, гиперэргическое функционирование при аутоиммунных и аллергических процессах и т. д. Очевидна необходимость проведения дальнейших фундаментальных исследований, направленных на выявление и уточнение иммунопатогенетической роли субпопуляций НГ при различных патологических процессах и, на этой основе, разработки новых подходов к ремоделированию негативно трансформированных фенотипов НГ, то есть создание новых иммунодиагностических и иммунотерапевтических стратегий.

Список литературы/References

1. Алешина Г.М., Шамова О.В., Перекрест С.В., Янкевич И.А., Семочкина А.Ю., Колобов А.А., Андреева Ю.В., Кокряков В.Н. Эндотоксин-нейтрализующее действие антимикробных пептидов // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 1–2. С. 72–77. [Aleshina G.M., Shamova O.V., Perekrst S.V., Yankelevich I.A., Semochkina A.Yu., Kolobov A.A., Andreeva Yu.V., Kokryakov V.N. Endotoxin-neutralizing effect of antimicrobial peptides. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2, pp. 72–77. (In Russ.)]
2. Гусакова Н.В., Новикова И.А. Функциональная активность нейтрофилов при хронической рецидивирующей герпетической инфекции // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 2. С. 169–176. [Gusakova N.V., Novikova I.A. Functional activity of neutrophils in chronic recurrent herpetic infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 2, pp. 169–176. doi: 10.15789/1563-0625-2013-2-169-176 (In Russ.)]
3. Дидковский Н.А., Малашенкова И.К., Танасова А.Н., Шепеткова И.Н., Зуйков И.А. Герпес-вирусная инфекция: клиническое значение и принципы терапии // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12, № 7. С. 459–464. [Didkovskij N.A., Malashenkova I.K., Tanasova A.N., Shhepetkova I.N., Zujkov I.A. Herpes-viral infection: clinical significance and principles of therapy. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, vol. 12, no. 7, pp. 459–464. (In Russ.)]
4. Долгушин И.И., Семенова А.Б., Шишкова Ю.С., Казачков Е.Л., Важенин А.В., Шаманова А.Ю. Структурные особенности процессов формирования нейтрофильными гранулоцитами сетей внеклеточной ДНК при встрече с опухолевыми клетками карциномы гортани // Уральский медицинский журнал. 2015. № 9. С. 119–122. [Dolgushin I.I., Semenova A.B., Shishkova Yu.S., Kazachkov E.L., Vazhenin A.V., Shamanova A.Yu. Structural features of the process of formation of neutrophilic granulocytes networks extracellular DNA at a meeting with larynx carcinoma tumor cells. *Ural'skii meditsinskii zhurnal = The Urals Medical Journal*, 2015, no. 9, pp. 119–122. (In Russ.)]
5. Злотникова М.В., Новикова И.А. Функциональная активность нейтрофилов и перекисное окисление липидов при тяжелой форме герпетической инфекции // Проблемы здоровья и экологии. 2011. Т. 27, № 1. С. 70–76. [Zlotnikova M.V., Novikova I.A. Functional activity of neutrophils and lipid peroxidation in severe form of herpetic infection. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Problems of Health and Ecology*, 2011, vol. 27, no. 1, pp. 70–76. (In Russ.)]
6. Колесникова Н.В., Ковалева С.В., Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В. Коррекция нарушений рецепторной функции нейтрофильных гранулоцитов на этапе прегавидарной подготовки // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8, № 3. С. 697–699. [Kolesnikova N.V., Kovaleva S.V., Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V.]

- Correction of violations receptor function of neutrophilic granulocytes in step pregravidal training. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8, no. 3 (17), pp. 697–699. (In Russ.)
7. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2011. № 1. С. 79–87. [Kravcov A.L., Shmel'kova T.P. Neutrophil secretory degranulation as a trigger of inflammation and regulator of immune response: role of serine leukocyte proteases and protease-activated receptor. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention*, 2011, no. 1 (56), pp. 79–87. (In Russ.)]
 8. Маркова Т.П. Часто болеющие дети. Взгляд иммунолога. М.: Торус Пресс, 2014. 192 с. [Markova T.P. Chasto bolelyushchie deti. Vzglyad immunologa [Often ill children. The look of an immunologist]. Moscow: Torus Press, 2014, 192 p.]
 9. Нагоев Б.С., Камбачокова З.А. Функционально-метаболическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных рецидивирующей герпетической инфекцией // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 3. С. 38–41. [Nagoev B.S., Kambachokova Z.A. Functional-metabolic activity of neutrophilic granulocytes in patients with recurrent herpetic infection. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 38–41. (In Russ.)]
 10. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В. Ремоделирование структуры хроматина и изменение фенотипа нейтрофильных гранулоцитов под влиянием G-CSF у больных колоректальным раком // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. С. 601. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Evglevskij A.A., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Fomicheva E.V. Remodeling of chromatin structure and changes in the phenotype of neutrophilic granulocytes under the influence of G-CSF in patients with colorectal cancer. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2014, no. 3, p. 601. (In Russ.)]
 11. Нестерова И.В., Ковалёва С.В., Чудилова Г.А., Коков Е.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Уваров И.Б., Казанцева М.В. Особенности фенотипа нейтрофильных гранулоцитов при неопластических процессах // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4, № 4. С. 374–380. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Kokov E.A., Lomtaticidze L.V., Storozhuk S.V., Uvarov I.B., Kazantseva M.V. Peculiarities of the phenotype of neutrophilic granulocytes in neoplastic processes. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2010, vol. 4, no. 4 (13), pp. 374–380. (In Russ.)]
 12. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Евглевский А.А. Двойственная роль нейтрофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевой защиты // Иммунология. 2012. Т. 33, № 5. С. 281–288. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Evglevskij A.A. The dual role of neutrophils in the implementation of the antitumor protection. *Immunologiya = Immunology*, 2012, vol. 33, no. 5, pp. 281–288. (In Russ.)]
 13. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Тараканов В.А., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Фомичева Е.В., Кокова Л.Н., Стрюковский А.Е. Различные варианты дефектов функционирования нейтрофильных гранулоцитов при врожденных пневмониях у новорожденных // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6, № 2. С. 170–176. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Kleshchenko E.I., Tarakanov V.A., Smerchinskaja T.V., Sapun O.I., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Fomicheva E.V., Kokova L.N., Stryukovskij A.E. Different variants of functioning defects of neutrophil granulocytes in patients with congenital pneumonia in newborns. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, vol. 6, no. 2, pp. 170–176. (In Russ.)]
 14. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Клещенко Е.И., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Смерчинская Т.В., Сапун О.И., Сторожук С.В. Варианты трансформации фенотипа нейтрофильных гранулоцитов CD64+CD32+CD11b+ у новорожденных с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями // Цитокины и воспаление. 2011. Т. 10, № 4. С. 61–65. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Kleshchenko E.I., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Smerchinskaya T.V., Sapun O.I., Storozhuk S.V. Variants of CD64+CD32+CD11b+ neutrophil phenotype transformation in infants with various infectious and inflammatory diseases. *Citokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 61–65. (In Russ.)]
 15. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Сапун О.И., Клещенко, Е.И., Смерчинская Т.В. Ремоделирование фенотипа субпопуляций CD64–CD16+CD32+CD11b+ и CD64+CD16+CD32+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии у глубоко недоношенных новорожденных // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8, № 1. С. 48–53. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Sapun O.I., Kleshchenko E.I., Smerchinskaya T.V. Remodeling of the phenotype of CD64–CD16+CD32+CD11b+ and CD64+CD16+CD32+CD11b+ subtypes of neutrophilic granulocytes in congenital pneumonia in deeply preterm infants. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 48–53 (In Russ.)]
 16. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле // Иммунология. 2015. Т. 35, № 4. С. 257–265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskij A.A. Neutrophilic granulocytes: a new look at “old players” on the immunological field. *Immunologiya = Immunology*, 2015, vol. 35, no. 4, pp. 257–265. (In Russ.)]
 17. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Колесникова Н.В., Авдеева М.Г., Русинова Т.В. Дифференцированность вариантов субпопуляций трансформированного фенотипа CD16+CD11b+ нейтрофильных гранулоцитов при острой вирусной и острой бактериальной инфекциях // Иммунология. 2016. Т. 37, № 4. С. 199–204. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Kolesnikova N.V., Avdeeva M.G., Rusinova T.V. Differentiation of variants of subpopulations of the transformed CD16+CD11b+ phenotype of neutrophilic granulocytes in acute viral and acute bacterial infections. *Immunologiya = Immunology*, 2016, vol. 37, no. 4, pp. 199–204. doi: 10.18821/0206-4952-2016-37-4-199-204 (In Russ.)]
 18. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Роменская В.А., Фомичева Е.В., Быковская Е.Ю. Нейтрофильные гранулоциты — ключевые клетки иммунной системы // Аллергология и иммунология. 2008. Т. 9, № 4. С. 432–435. [Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Romenskaya V.A., Fomicheva E.V., Bykovskaya E.Yu. Granulocytes — key cells of the immune system. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2008, vol. 9, no. 4, pp. 432–435. (In Russ.)]

19. Новикова И.А., Романива О.А. Особенности продукции цитокинов при рецидивирующей герпетической инфекции // Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 6. С. 571–576. [Novikova I.A., Romaniva O.A. Features of the production of cytokines in recurrent herpetic infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2013, vol. 15, no. 6, pp. 571–576. (In Russ.)]
20. Русинова Т.В., Чудилова Г.А., Колесникова Н.В. Сравнительная оценка иммуотропных эффектов in vitro дерината и синтетического агониста TLR9 на рецепторную функцию нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в норме и при инфекционном процессе // Кубанский научный медицинский вестник. 2016. № 5. С. 94–97. [Rusinova T.V., Chudilova G.A., Kolesnikova N.V. Comparative analysis immunotropic effects in vitro derinat and synthetic TLR9 agonist on receptor function of neutrophilic granulocytes and monocytes in normal and infectious process. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2016, no. 5, pp. 94–97. (In Russ.)]
21. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология. 3-е изд. М.: Медицина. 2010. 752 с. [Haitov R.M., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. Immunologiya. Norma i patologiya [Immunology. Health and disease]. 3rd ed. Moscow: Meditsina, 2010, 752 p.]
22. Beyrau M., Bodkin J.V., Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.*, 2012, vol. 2, no. 11, pp. 120–134. doi: 10.1098/rsob.120134
23. Cortjens B., Ingelse S.A., Calis J.C., Valar A.P., Koendetman L., Bem R.A., van Woensel J.B. Neutrophil subset responses in infants with severe viral respiratory infection. *Clin. Immunol.*, 2017, vol. 176, pp. 100–106. doi: 10.1016/j.clim.2016.12.012
24. De Lorenzo B.H., Godoy L.C., Novaes e Brito R.R., Pagano R.L., Amorim-Dias M.A., Grosso D.M., Lopes J.D., Mariano M. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. *Immunobiology*, 2010, vol. 215, no. 5, pp. 341–347. doi: 10.1016/j.imbio.2009.05.013
25. De Oliveira-Junior E.B., Bustamante J., Newburger P.E., Condino-Neto A. The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2011, vol. 73, no. 5, pp. 420–427. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02501.x
26. Drescher B., Bai F. Neutrophil in viral infections, friend or foe? *Virus Res.*, 2013, vol. 171, iss. 1, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.virus-res.2012.11.002
27. Drifte G., Dunn-Siegrist I., Tissières P., Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.*, 2013, vol. 41, no. 3, pp. 820–832. doi: 10.1097/CCM.0b013e318274647d
28. Elbim C., Katsikis P.D., Estaquier J. Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol. J.*, 2009, vol. 3, pp. 52–59. doi: 10.2174/1874357900903010052
29. Elghetany M.T. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002, vol. 28, no. 2, pp. 260–274.
30. Feng X., Deng T., Zhang Y., Su S., Wei C., Han D. Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by regulating the production of tumour necrosis factor α and growth arrest-specific gene 6. *Immunol.*, 2011, vol. 132, iss. 2, pp. 287–295. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03364.x
31. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*, 2009, vol. 16, no. 3, pp. 183–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
32. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Autoimmunity and transplantation / Immunobiology: the-immune system in health and disease. Sixth edition. Chapter 13. New York: Garland Science Publishing, 2005, 800 p.
33. Klebanoff S.J., Kettle A.J., Rosen H., Winterbourn C.C., Nauseef W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J. Leukoc. Biol.*, 2013, vol. 93, no. 2, pp. 185–198. doi: 10.1189/jlb.0712349
34. Leliefeld P.H., Wessels C.M., Leenen L.P., Koenderman L., Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit. Care*, 2016, vol. 20:73. doi: 10.1186/s13054-016-1250-4
35. Lukens M.V., van de Pol A.C., Coenjaerts F.E., Jansen N.J., Kamp V.M., Kimpen J.L., Rossen J.W., Ulfman L.H., Tacke C.E., Viveen M.C., Koenderman L., Wolfs T.F., van Bleek G.M. A systemic neutrophil response precedes robust CD8⁺ T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 5, pp. 2374–2383. doi: 10.1128/JVI.01807-09
36. Mantovani A., Cassatella M.C., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, no. 8, pp. 519–531. doi: 10.1038/nri3024
37. Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin. Immunol.*, 2006, vol. 118, no. 2–3, pp. 137–144.
38. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood*, 2013, vol. 121, no. 10, pp. 1677–1689. doi: 10.1182/blood-2012-07-445189
39. Metelitsa L.S., Gillies S.D., Super M., Shimada H., Reynolds C.P., Seeger R.C. Antidisialogangliosid/granulocyte macrophage-colony-stimulating factor fusion protein facilitates neutrophil antibody-dependent cellular cytotoxicity and depends on Fc γ RII(CD32) and Mac-1 (CD11b/CD18) for enhanced effector cell adhesion and azurophil granule exocytosis. *Blood*, 2002, vol. 99, no. 11, pp. 4166–4173.
40. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Kolesnikova N.V., Kleshchenko E.I., Shinkareva O.N., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Kokova L.N. Optimization of interferon- and immunotherapy in immunocompromised children with associated viral infections. Allergy, Asthma & Immunophysiology: from basic science to clinical management. Medimond International Proceedings. Bologna: Filodiritto Publisher, 2013, pp. 101–104.
41. Oku R., Oda S., Nakada T.A., Sadahiro T., Nakamura M., Hirayama Y., Abe R., Tateishi Y., Ito M., Iseki T., Hirasawa H. Differential pattern of cell-surface and soluble TREM-1 between sepsis and SIRS. *Cytokine*, 2013, vol. 61, iss. 1, pp. 112–117. doi: 10.1016/j.cyto.2012.09.003

42. Pillay J., den Braber I., Vriskoop N., Kwast L.M., de Boer R.J., Borghans J.A., Tesselaar K., Koenderman L. In vivo labeling with $^3\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 2010, vol. 116, no. 4, pp. 625–627. doi: 10.1182/blood-2010-01-259028
43. Pillay J., Kamp V.M., Van Hoffen E., Visser T., Tak T., Lammers J.W., Ulfman L.H., Leenen L.P., Pickkers P., Koenderman L.A. Subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 1, pp. 327–336. doi: 10.1172/JCI57990
44. Pillay J., Tak T., Kamp V.M., Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013, vol. 70, iss. 20, pp. 3813–3827.
45. Scapini P., Cassatella M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 2014, vol. 124, no. 5, pp. 710–719. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217
46. Soehnlein O., Zernecke A., Eriksson E.E., Rothfuchs A.G., Pham C.T., Herwald H., Bidzhekov K., Rottenberg M.E., Weber C., Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 4, pp. 1461–1471. doi: 10.1182/blood-2008-02-139634
47. Tamassia N., Cassatella M.A. Cytoplasmic receptors recognizing nucleic acids and mediating immune functions in neutrophils. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 547–554. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.003
48. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, 2014, vol. 1124, pp. 451–467. doi: 10.1007/978-1-62703-845-4_27
49. Winterbourn C.C., Kettle A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid. Redox Signal*, 2013, vol. 18, no. 6, pp. 642–660. doi: 10.1089/ars.2012.4827
50. Woodfin A.L., Voisin M.B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F.M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger G.E., Meda P., Imhof B.A., Nourshargh S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 8, pp. 761–769. doi: 10.1038/ni.2062
51. Wynn J.L., Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin. Perinatol.*, 2010, vol. 37, no. 2, pp. 307–337. doi: 10.1016/j.clp.2010.04.001

Авторы:

Нестерова И.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры аллергологии и иммунологии Факультета повышения квалификации медицинских работников Медицинского института ФГБОУ ВО Российский университет дружбы народов Министерства образования и науки России (ФПК МИ ФГБОУ ВО РУДН), Москва, Россия; главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России (ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ), г. Краснодар, Россия;

Колесникова Н.В., д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Чудилова Г.А., к.б.н., доцент, зав. отделом клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Ломтатидзе Л.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Ковалева С.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Евглевский А.А., к.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии ЦНИЛ ФГБОУ ВО КГМУ, г. Краснодар, Россия;

Нгуен Т.З.Л., аспирант кафедры аллергологии и иммунологии ФПК МИ ФГБОУ ВО РУДН, Москва, Россия.

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Allergology and Immunology FAT MW of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation; Chief Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory (CSRL), Kuban State Medical University (KSMU) of Ministry of Health Development of Russia, Krasnodar, Russian Federation;

Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Chudilova G.A., PhD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Lomtadize L.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Evglevsky A.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Researcher, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the CSRL, KSMU, Krasnodar, Russian Federation;

Nguyen T.D.L., Postgraduate Student of the Department of Allergology and Immunology FAT MW of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation.

НОВЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА СЕПСИСА И СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА У ДЕТЕЙ. СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ТЕРАПИИ

А.П. Продеус^{1,2,3}, М.В. Устинова^{2,4}, А.А. Корсунский^{1,4}, А.Г. Гончаров³

¹ Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского, Москва, Россия

² НОЧУ ДПО Высшая медицинская школа, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, г. Калининград, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Сепсис на сегодняшний день является грозным осложнением инфекции и первопричиной детской смертности в отделении реанимации и интенсивной терапии. В последние десятилетия все чаще стал подниматься вопрос о важности контроля над активацией системы комплемента при сепсисе и септическом шоке. Доказано на животных моделях, что комплемент играет одну из ключевых ролей патологического механизма в развитии гиперактивного иммунного ответа, впоследствии приводящего к нарушению иммунологического гомеостаза. Мыши, имевшие дефицит C3–/– и C4–/– и получившие летальную дозу липополисахарида (LPS) внутрибрюшинно, показали лучшую выживаемость по сравнению с контрольной группой беспородных животных. Имеются данные клинических исследований, подтверждающие активное участие комплемента в цепочке септического процесса. Было показано, что у больных с сепсисом концентрация C3 и C4 белков достоверно коррелировала со смертностью на момент постановки диагноза. В результате активации 3 путей комплемента, образуются хемоаттрактанты C3a и C5a, которые способствуют высвобождению большого количества цитокинов, провоцируя «цитокиновый шторм». Цитокины повреждают стенку сосудистого эндотелия, делая ее более проницаемой, что служит причиной запуска ДВС-синдрома и полиорганной недостаточности. Триггером асептического воспаления будет являться ишемия и реперфузия, возникающая из-за децентрализации кровотока и развития ДВС-синдрома. Контроль над работой комплемента осуществляет эндогенный ингибитор C1-эстеразы, блокирующий классический путь активации и пристеночную систему коагуляции. Исследователи отмечают, что у животных и пациентов с сепсисом имеется значительный дефицит эндогенного C1-INH, что было подтверждено лабораторно и клинически. Впервые в клинике препарат C1-INH (Berinert, CSL Behring) появился более 25 лет назад и использовался для терапии наследственного ангионевротического отека (НАО). За последние 10 лет накопилось достаточное количество данных о применении C1-INH при иных патологиях, таких как инфаркт миокарда, ишемическая и реперфузионная травма и травмы, спровоцированные аппаратами искусственного кровообращения (ИК). Применение ингибитора C1-эстеразы на животных с сепсисом и в клинических исследованиях показало свою эффективность и безопасность.

Ключевые слова: сепсис, септический шок, система комплемента, ишемия, реперфузия.

Адрес для переписки:

Продеус Андрей Петрович
123317, Россия, Москва, Шмитовский пр-д, 29,
ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского.
Тел./факс: 8 (499) 256-64-44.
E-mail: prodeus@mail.ru

Contacts:

Andrei P. Prodeus
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovsky pr-d, 29,
Speransky Children's Hospital No. 9.
Phone/fax: +7 (499) 256-64-44.
E-mail: prodeus@mail.ru

Библиографическое описание:

Продеус А.П., Устинова М.В., Корсунский А.А., Гончаров А.Г.
Новые аспекты патогенеза сепсиса и септического шока у детей.
Система комплемента как мишень для эффективной терапии //
Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 19–24.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-19-24

Citation:

Prodeus A.P., Ustinova M.V., Korsunskiy A.A., Goncharov A.G. New aspects of sepsis and septic shock pathogenesis in children. The complement system as target for an effective therapy // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 19–24. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-19-24

NEW ASPECTS OF SEPSIS AND SEPTIC SHOCK PATHOGENESIS IN CHILDREN. THE COMPLEMENT SYSTEM AS TARGET FOR AN EFFECTIVE THERAPY

Prodeus A.P.^{a,b,c}, Ustinova M.V.^{b,d}, Korsunskiy A.A.^{a,d}, Goncharov A.G.^c

^a *Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation*

^b *Higher Medical School, Moscow, Russian Federation*

^c *I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

^d *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. Nowadays sepsis is grave complication of infection and the cause of death reanimation. In this survey, we would like to emphasize the importance of the control over the activation of the complement system. It has been proved of animal model a complement one of the key role in the development of hyperactive immunity response, later resulting in violation of immunity homeostasis. Mice which had C3^{-/-}, C4^{-/-} deficit, after receiving a LPS dose intraperitoneally showed a better survival to compare with the control group of animals. There exist clinical data which confirm active participation of the complement in the chain of the septic process. The research showed the patient affected by sepsis, had protein C3 and C4 concentration correlating with mortality at the time of diagnosis. These are chemoattractants, protein C3a and C5a, turn to be the result of complement pathway activation. The chemoattractants provoke the extraction of a big number of cytokines. Vessels permeability increase and DIC-syndrome activation with it, multiple organ dysfunction develops. Ischemia-reperfusion launch triggers aseptic inflammation, which appears decentralization and DIC-syndrome. C1-INH controls the work of classical way complement and Hemostasis System. Researchers the deficit in C1-INH animals and patients affected by sepsis, which is proved in laboratory and clinics. The remedy C1-INH (Berinert, CSL Behring) appeared over 25 years ago and was used in therapy of hereditary angioedema. For the last years we accumulated a considerable quantity of facts of C1-INH use which after pathologies: heart attack, Ischemia-reperfusion injury, trauma provoked by cardiopulmonary bypass. The use of C1-INH on animal models of sepsis in clinical research their efficacy and safety.

Key words: *sepsis, septic shock, the complement system, ischemia, reperfusion.*

На протяжении веков, от Гиппократов до Н.И. Пирогова, сепсис вызывал особый интерес. И в наше время этот вопрос не потерял своей актуальности из-за высокой летальности. Сепсис — жизнеугрожающая органная дисфункция, вызванная дисрегуляцией ответа хозяина на инфекцию [1].

Попадая в кровоток, бактерия уничтожается за счет фагоцитоза. При снижении реактивности организма происходит массивное размножение инфекционных агентов, что провоцирует сдвиг баланса про- и противовоспалительной систем в сторону воспаления. В большом количестве вырабатываются цитокины, что приводит к полиорганной недостаточности и смерти [6]. Система комплемента вносит огромный вклад в развитие этих процессов. Являясь частью врожденного иммунитета, она первая сталкивается с инфекционным агентом, проникшим в организм [2]. Существует три пути активации системы комплемента: классический, альтернативный и лектиновый. Классический путь активируется за счет образования комплекса АГ-АТ (при участии IgG или IgM), что в дальнейшем приводит к расщеплению белков C4 и C2 и образованию активной C3 конвертазы. Лектиновый путь приводит в действие комплекс MASP-1 и MASP-2 с MBL (манноза-связывающим лектином) на поверхности бактерии; как и в классическом пути, образуется активная C3 конвертаза [4, 10].

Альтернативный путь независимо от бактерии инициируется пропептидином и циркули-

рующим комплексом C3bBb, что в свою очередь образует активную конвертазу C3. Далее весь каскад реакции идет по единому пути с расщеплением C3 на C3a и C3b, а C3b, взаимодействует с циркулирующими C3bBb и C4b2b, что образует активную C5 конвертазу. Подобно конструктору, происходит сборка на мембране бактериальной клетки МАК (мембрано-атакующего комплекса) из белков C5–9. МАК лизирует бактериальную клетку, а также участвует в апоптозе. В свою очередь C3a и C5a, являясь мощными хемоаттрактантами, активируют нейтрофилы и макрофаги, что приводит к выбросу цитокинов: IL-8, TNF α , а также высвобождению гистамина из тучных клеток [15, 19].

Система комплемента — важный участник иммунного ответа, от нее зависит эффективная нейтрализация чужеродного агента (вирусы, бактерии, грибы, паразиты) [15]. Было показано, что мыши, имевшие дефицит C3^{-/-}, C4^{-/-}, Btk^{-/-}, RAD^{-/-} более чувствительны к вводимому эндотоксину, по сравнению с контрольной группой беспородных мышей. Лечение очищенным C3 белком, приводило к повышению выживаемости животных в экспериментальной модели сепсиса [6, 12]. Важно отметить, что недоношенные дети имеют дефицит C1 и C4 белков комплемента, что объясняет их большую склонность к инициации сепсиса и септического шока [16].

При сепсисе происходит «сбой» адекватного ответа системы комплемента на инфекцию, что влечет за собой бесконтрольный выброс хемоаттрактантов C3a и C5a, связывающихся с рецеп-

торами на поверхности макрофагов и нейтрофилов, способствуя высвобождению большого пула цитокинов [17]. Повреждаются сосудистый эндотелий, усиливается его проницаемость за счет адгезии нейтрофилов, что способствует выходу жидкости во внесосудистое русло и приводит к нарушению микроциркуляции и отеку. В этот процесс вносят свой вклад тучные клетки, из которых высвобождается гистамин. Поврежденные эндотелиоциты начинают активно продуцировать NO, что приводит к вазодилатации и следующей за ней вазоплегии, вследствие чего происходит падение артериального давления (АД). Из-за резкого падения АД, возникает децентрализация кровотока. Нарушается периферическое кровоснабжение органов, провоцируется гипоксия и ишемия тканей [9].

Белок С5а как один из ключевых звеньев сепсиса активирует пристеночную систему коагуляции, а именно фактор XII и калликреин, что способствует возникновению микротромбозов и ДВС-синдрома [7].

Усугубляет ситуацию эндотоксический шок, спровоцированный массивным лизисом бактерий и выбросом эндотоксина. Активация ККС, высвобождение брадикинина вносит свой вклад в развитие полиорганной недостаточности и септического шока [17].

В эксперименте у крыс и мышей, имеющих дефицит С3—/— и С4—/—, показана наилучшая выживаемость в модели сепсиса и септического шока по сравнению с контрольной группой бес-

породных животных. Установлено, что у больных с сепсисом и септическим шоком достоверно повышен уровень С3 и С5 белков, что коррелировало с частотой летальных исходов у таких пациентов [10, 14, 15].

Существенное влияние оказывается компонентом и в реперфузионном повреждении, следующим за ишемией. Во время ишемии происходит переключение гликолиза с аэробного пути на анаэробный, следствием является накопление активных форм кислорода и жирных кислот. Последние вызывают перекисное окисление липидов и активируют лектиновый путь комплемента при участии IgM. Важным открытием было участие иммуноглобулинов в инициации реперфузионной травмы. Показано, что мыши, имеющие дефицит IgM, более устойчивы в модели ишемии и реперфузии, нежели животные контрольной группы [11].

Хемоаттрактанты С3а и С5а связываются с рецепторами на поверхности макрофагов и нейтрофилов, благодаря чему высвобождаются цитокины, которые инициируют асептическое воспаление. Из-за нарушения гликокаликса, меняется заряд мембраны эндотелия, происходит адгезия нейтрофилов. Разрушение эндотелия приводит к синдрому капиллярной утечки, образованию МАК и апоптозу разрушенных эндотелиоцитов [6].

Исходя из патогенеза, нужно рассматривать систему комплемента как дополнительную мишень для терапии сепсиса и септического

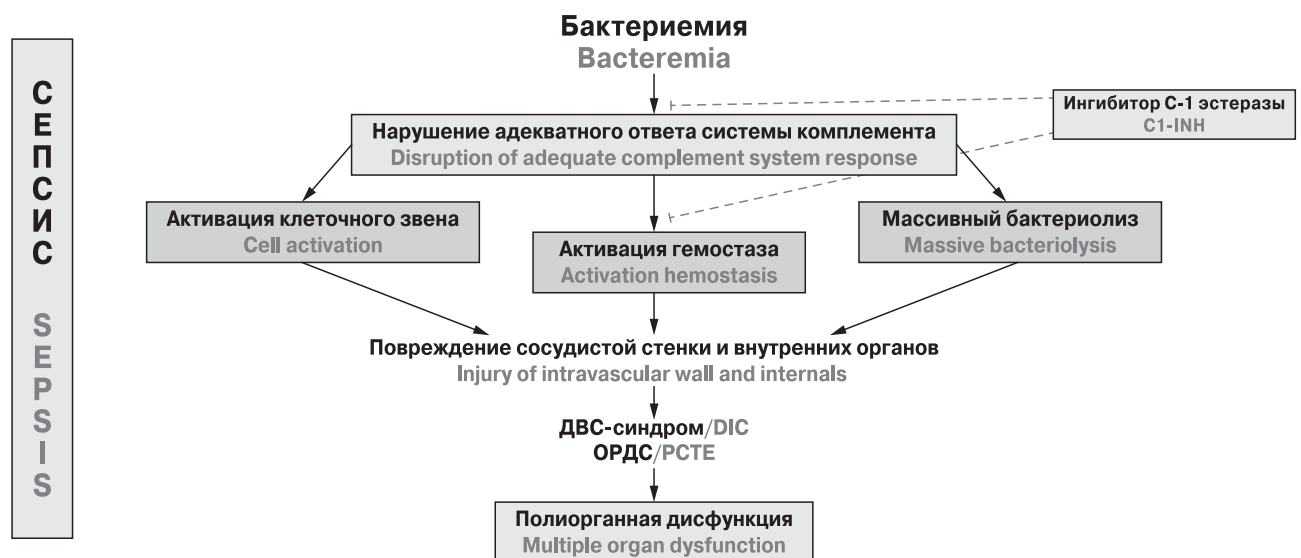


Рисунок 1. Краткий механизм развития полиорганной недостаточности при сепсисе

Figure 1. Brief mechanism of multiple organ failure in sepsis

Массивная бактериемия приводит к нарушению адекватного ответа системы комплемента на инфекцию, запуская сепсис. Комплемент-опосредованные механизмы приводят к повышенной сосудистой проницаемости, провоцируя ДВС-синдром, исходом которого будет полиорганная дисфункция.

Massive bacteremia leads to disruption of adequate complement system response to infection, sepsis running. Complement-mediated mechanisms that lead to increased vascular permeability, causing DIC, whose outcome will multiple organ dysfunction.

шока. Существует эндогенный ингибитор классического и лектинового пути комплемента — ингибитор C1-эстеразы. По своей природе он относится к классу сериновых протеаз, наряду с альфа-1-антитрипсином, антитромбином. Вырабатывается фибробластами, моноцитами, макрофагами, эндотелиальными клетками и амниотическими эндотелиальными клетками. Особенно важен его синтез в очаге воспаления для регуляции иммунного ответа комплемента. При сепсисе его синтез резко снижается, что было определено у пациентов и достоверно коррелировало с уровнем выживаемости. Помимо блокады комплемента, ингибитор C1 эстеразы блокирует факторы XII, XIa, плазмин и каликренин, что останавливает тромбообразование и препятствует развитию ДВС-синдрома. В многочисленных доклинических моделях сепсиса у собак, мышей, крыс, кроликов и бабуинов, терапия высокими дозами препарата C1-INH (Berinert, CSL Behring), доказала свою эффективность [3, 13]. Введение C1-INH септическим животным уменьшало лейкоцитарную инфильтрацию, сосудистую проницаемость и последствия реперфузионной травмы [18].

Препарат C1-INH был введен в клиническую практику более 25 лет назад для лечения наследственного ангионевротического отека, обусловленного дефектом эндогенного ингибитора C1-эстеразы [8]. Важным аспектом является отсутствие токсического и иммуномодулирующего действия препарата, вводимого животным, даже при двадцатикратном повышении дозы препарата. За последние двадцать лет накопилось большое количество информации об успешном использовании в клинических исследованиях C1-INH при сепсисе и тяжелом септическом шоке. Применение C1-ингибитора в высоких дозах нормализует показатели гемодинамики, уменьшает воспаление и синдром капиллярной утечки, снимает отеки [20].

Использование C1-INH у детей перед операцией по коррекции пороков межжелудочковой перегородки с использованием аппарата искусственного кровообращения положительно повлияло на послеоперационный период. В группе с C1-INH наблюдались лучшие показатели оксигенации и меньший отек, спровоцированный синдромом капиллярной утечки. Механизм действия препарата и патофизиологические механизмы отражены на рисунках 1 и 2 [5, 21].

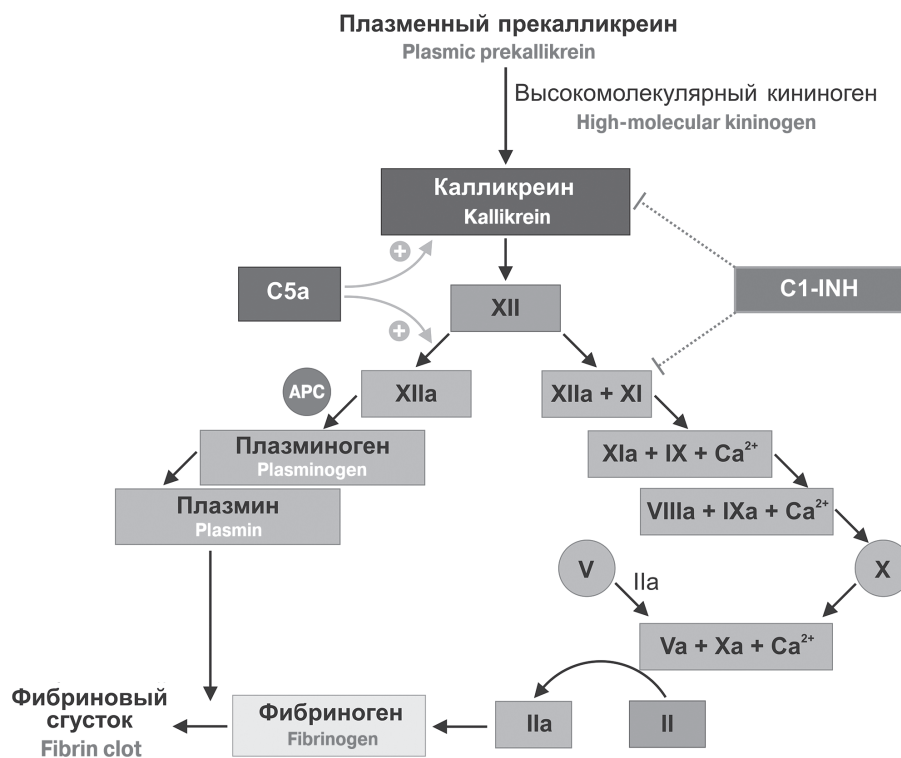


Рисунок 2. Активация пристеночной системы коагуляции

Figure 2. Parietal activation of the coagulation system

При сепсисе белки комплемента C5a будут являться дополнительным звеном в запуске ДВС-синдрома, оказывая положительное действие на калликреин и XIIa фактор, что спровоцирует образование микротромбов.

*APC — активированный протеин C.

In sepsis, C5a complement proteins will be an additional link in the start of DIC, with positive effects on the kallikrein and factor XIIa that trigger the formation of microthrombi. *APC — activated protein C.

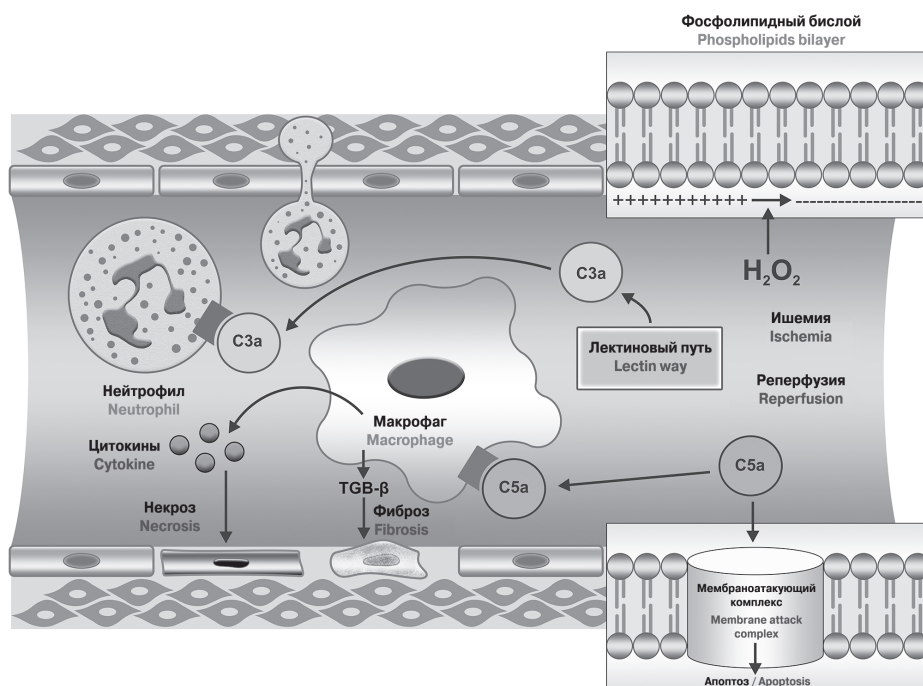


Рисунок 3. Механизм ишемического и реперфузионного повреждения

Figure 3. Mechanism of ischemic and reperfusion injury

Ишемия и реперфузия, возникшие из-за децентрализации кровотока, как инициаторы апоптоза и повышения сосудистой проницаемости эндотелия. Клетки, подвергшиеся ишемии и воздействию свободных форм кислорода, нежизнеспособны. Их апоптоз осуществляет комплемент через классический и лектиновый путь. C3a и C5a, взаимодействуя с рецепторами на макрофагах и нейтрофилах, приведут к большому выбросу цитокинов, что приведет к некрозу, а выделение из макрофагов TGF-β будет способствовать фиброзу. И, как дополнение, образование мембраноатакующих комплексов на ишемизированных клетках также приведет к апоптозу.

Ischemia and reperfusion, arising from the decentralization of blood flow, as initiators of apoptosis and enhance the vascular endothelial permeability. The cells were subjected to ischemia and the effects of reactive oxygen species, are not viable. They shall complement apoptosis through classical and lectin pathway. C3a and C5a interacting with receptors on macrophages and neutrophils lead to a large cytokine release that leads to necrosis and selection of TGF-β macrophages will promote fibrosis. And as a complement, the formation of membrane attack complexes in ischemic cells as regards to apoptosis.

Выводы

Бесспорно, система комплемента занимает одну из главных мест в развитии воспаления любого генеза и участвует в регуляции иммунологического гомеостаза, который значительно нарушен при сепсисе и септическом шоке. Применение C1-INH при сепсисе и септическом шоке может стать новым эффективным способом борьбы с развившимся ДВС-синдромом, исходя из

патофизиологических механизмов и точек приложения препарата. Положительный результат от терапии C1-INH у септических больных дает основание полагать, что использование его у детей с сепсисом и ДВС-синдромом сможет не только снизить смертность, но и сократить срок пребывания детей в отделении реанимации и интенсивной терапии. В свою очередь остается открытым вопрос об использовании C1-INH при других патологиях, которые опосредованы комплементом.

Список литературы/References

1. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 1–2. С. 9–20. [Chereshnev V.A., Gusev E.Yu. Immunological and pathophysiological mechanisms of systemic inflammation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 1–2, pp. 9–20. doi: 10.15789/1563-0625-2012-1-2-9-20 (In Russ.)]
2. Beltrame M.H., Boldt A.B., Catarino S.J., Mendes H.C., Boschmann S.E., Goeldner I., Messias-Reason I. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. *Mol. Immunol.*, 2015, vol. 67, iss. 1, pp. 85–100. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.245
3. Caliezi C., Wuillenun W.A., Zeerleder S., Redondo M., Eisele B., Hack C.E. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharm. Rev.*, 2000, vol. 52, no. 1. pp. 92–112.
4. Chan R.K., Ding G., Verna N., Ibrahim S., Oakes S., Austen Jr.W.G., Hechtman H.B., Moore Jr.F.D. IgM binding to injured tissue precedes complement activation during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J. Surg. Res.*, 2004, vol. 122, no. 1, pp. 29–35. doi: 10.1016/j.jss.2004.07.005

5. Charchaflieh J., Wei J., Labaze G., Hou Y.J., Babarsh B., Stutz H., Lee H., Worah S., Zhang M. The role of complement system in septic shock. *Clin. Develop. Immunol.*, 2012, 8 p. doi: 10.1155/2012/407324
6. Cinel I., Opal S.M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 291–304. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819267fb
7. Haeney M.R. The role of the complement cascade in sepsis. *J. Antimicrob. Chemotherap.*, 1998, no. 41, iss. 1, pp. 41–46. doi: 10.1093/jac/41.suppl_1.41
8. Hazelzet J.A., de Groot R., van Mierlo G., Joosten K.F., van der Voort E., Eerenberg A., Suur M.H., Hop W.C., Hack C.E. Complement activation in relation to capillary leakage in children with septic shock and purpura. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 11, pp. 5350–5356.
9. Hogasen A.K.M., Overlie I., Hansen T.W.R., Abrahamsen T.G., Finne P.H., Kolbjorn H. The analysis of the complement activation product is applicable in neonates in spite of their profound C9 deficiency. *J. Perinat. Med.*, 2000, no. 28, pp. 39–48. doi: 10.1515/JPM.2000.006
10. Karnaukhova E. C1-Esterase inhibitor: biological activities and therapeutic applications. *J. Hematol. Thromb. Dis.*, 2013, vol. 1, iss. 3:113. doi: 10.4172/2329-8790.1000113
11. Lupu F., Keshari R.S., Lambris J.D., Coggeshall K.M. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb. Res.*, 2014, vol. 133, suppl. 1, pp. 28–31. doi: 10.1016/j.thromres.2014.03.014
12. Markiewski M.M., Lambris J.D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am. J. Pathol.*, 2007, vol. 171, iss. 3, pp. 715–727. doi: 10.2353/ajpath.2007.070166
13. Pham H., Santucci S., William H.Y. Successful use of daily intravenous infusion of C1 esterase inhibitor concentrate in the treatment of a hereditary angioedema patient with ascites, hypovolemic shock, sepsis, renal and respiratory failure. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2014, no. 10:62. doi: 10.1186/s13223-014-0062-9
14. Prodeus A.P., Zhou X., Maurer M., Stephen J. G., Carroll C.C. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature*, 1997, vol. 390, pp. 172–175. doi: 10.1038/36586
15. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M. The Third International Consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016, vol. 315, iss. 8, pp. 801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287
16. Singer M., Jones A.M. Bench-to-bedside review: the role of C1-esterase inhibitor in sepsis and other critical illnesses. *Crit. Care*, 2011, no. 15:203. doi: 10.1186/cc9304
17. Takahashi M., Iwaki D., Kanno K., Ishida Y., Xiong J., Matsushita M., Endo Y., Miura S., Ishii N., Sugamura K., Fujita T. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 9, pp. 6132–6138. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6132
18. Tarnow-Mordi W., Isaacs D., Dutta S. Adjunctive immunologic interventions in neonatal sepsis. *Clin. Perinat.*, 2010, vol. 37, iss. 2, pp. 481–499. doi: 10.1016/j.clp.2009.12.002
19. Tassani P., Kunkel R., Richter J.A., Hannelore O., Hans P.L., Braun S.L., Eising G.P., Haas F., Paek S.U., Bauernschmitt R., Jochum M. Effect of C1-esterase-inhibitor on capillary leak and inflammatory response syndrome during arterial switch operations in neonates. *J. Cardio. Vas. Anest.*, 2001, vol. 15, iss. 4, pp. 469–473. doi: 10.1053/jcan.2001.24989
20. Walport M.J. Complement. *N. Engl. J. Med.*, 2001, vol. 344, pp. 1058–1066. doi: 10.1056/NEJM200104053441406
21. Zhang M., Takahashi K., Alicot E.M., Vorup-Jensen T., Kessler B., Thiel S., Jensenius J.C., Ezekowitz R.A.B., Moore F.D., Carroll M.C. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, iss. 7, pp. 4727–4734. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4727

Авторы:

Продеус А.П., д.м.н., профессор, главный педиатр ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского, Москва, Россия; зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии Высшей медицинской школы, Москва, Россия; профессор-консультант Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград, Россия;

Устинова М.В., студентка 6 курса педиатрического факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия; лаборант кафедры клинической иммунологии и аллергологии Высшей медицинской школы, Москва, Россия;

Корсунский А.А., д.м.н., профессор, главный врач ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского, Москва, Россия; зав. кафедрой педиатрии и детских инфекционных болезней ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Гончаров А.Г., к.м.н., врач-иммунолог, директор Института живых систем Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград, Россия.

Authors:

Prodeus A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Pediatrician, Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation; Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, Higher Medical School, Moscow, Russian Federation; Visiting Professor, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation;

Ustinova M.V., Undergraduate Student of Pediatric Faculty, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; Laboratory Assistant, Department of Clinical Immunology and Allergology, Higher Medical School, Moscow, Russian Federation;

Korsunskiy A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Medical Officer, Speransky Children's Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation; Head of Pediatrics and Children's Infectious Diseases Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Goncharov A.G., PhD (Medicine), Immunologist, Director of the Living Systems Institute, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.12.2016
Отправлена на доработку 31.01.2017
Принята к печати 06.06.2017

Received 05.12.2016
Revision received 31.01.2017
Accepted 06.06.2017

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГРИППА А ПОДТИПОВ Н1, Н5 И Н9 В МАКРОФАГАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ТНР-1

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева, Р.Р. Климова, О.В. Масалова, А.А. Куш

ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Макрофаги (Мф) играют важную роль в патогенезе гриппозной инфекции, однако получение Мф в больших количествах затруднительно. В связи с этим в настоящей работе для изучения гриппозной инфекции были использованы ТНР-1 моноциты, дифференцированные флороболовым эфиром (РМА) в макрофаги (Мф). Дифференцированные клетки — ТНР-РМА Мф заражали пандемическим А(Н1N1)pdm09 и птичьими вирусами гриппа А(Н5N2) и А(Н9N2). Обнаружены различия в уровнях проникновения вирусных РНК (ген М1) и белков нуклеокапсида (NP) исследованных вирусов. Уровни экспрессии вирусных РНК и белков были значительно выше в клетках, зараженных птичьими вирусами, по сравнению с пандемическим. Особый интерес представляет феномен длительного внутриклеточного присутствия вирусных РНК и ядерная локализация белка NP. Однако инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов всех изученных подтипов в культуральной жидкости вплоть до 96 ч обнаружено не было. Это указывает на abortивный характер гриппозной инфекции в ТНР-РМА Мф. Тем самым Мф выполняет особую функцию депонирования вирусных компонентов и доставки их в места воспаления. Блокирующий механизм у вирусов гриппа А человека и птиц с разной патогенностью может различаться вследствие существования многообразных механизмов ускользания от иммунного ответа. В результате заражения человеческим вирусом А(Н1N1)pdm09 инфекция развивалась медленно и к 72 ч вызывала гибель 25% клеток, тогда как при заражении птичьими вирусами уже через 24 ч наблюдалась гибель 50% клеток и к 72 ч все ТНР-РМА Мф погибали. Предобработка рекомбинантным IFN α 2b оказывала защитный эффект, подавляя накопление NP белка вируса А(Н5N2) в ядрах ТНР-РМА Мф. Полученные данные позволяют заключить, что одной из причин различного течения и исхода гриппозной инфекции при заражении человека вирусами гриппа А является чувствительность макрофагов человека к вирусам гриппа птиц подтипов Н5 и Н9 по сравнению с пандемическим вирусом. Наш результат на модели ТНР-РМА Мф согласуется с сообщениями о блокировании этапов высвобождения инфекционных вирионов гриппа А в первичных культурах моноцитарных и альвеолярных Мф. Массивная гибель Мф, вызываемая вирусами гриппа птиц, объясняет их высокую патогенность.

Ключевые слова: инфекция, вирусы гриппа А, ТНР-РМА макрофаги, цитопатогенное действие, вирусные РНК, NP-белки.

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ.
Тел.: 8 (499) 190-30-49 (служебн.). Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Contacts:

Tatiana M. Sokolova
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (499) 190-30-49 (office). Fax: +7 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Библиографическое описание:

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Куш А.А. Сравнительная характеристика развития инфекции вирусом гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9 в макрофагах, дифференцированных из моноцитов ТНР-1 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 25–32. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-25-32

Citation:

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Klimova R. R., Masalova O.V., Kushch A.A. Comparative characteristics of the development of infection influenza A viruses of subtypes H1, H5 and H9 in macrophages differentiated from monocytes of THP-1 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 25–32. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-25-32

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE DEVELOPMENT OF INFLUENZA INFECTION IN MACROPHAGES DIFFERENTIATED FROM MONOCYTES OF THP-1 (INFLUENZA A VIRUSES OF SUBTYPES H1, H5 AND H9)

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Masalova O.V., Kushch A.A.
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Macrophages (Mf) play an important role in the pathogenesis of influenza infection, but the obtaining of Mf in large quantities is difficult. In connection with this, in the present study, THP-1 monocytes differentiated by phorbol ether (PMA) into macrophages (MF) were used to study influenza infection. Differentiated cells — THP-PMA Mf were infected with pandemic A(H1N1)pdm09 and avian influenza A viruses H5N2 and H9N2. Differences in the levels of penetration of viral RNA (gene M1) and nucleocapsid (NP) proteins of the investigated viruses were found. The levels of expression of viral RNA and proteins were significantly higher in cells infected with avian viruses compared to pandemic viruses. Of particular interest is the phenomenon of prolonged intracellular presence of viral RNAs and nuclear localization of NP protein. However, no infectious or haemagglutinating activity of the virus of all subtypes studied in the culture liquid was detected up to 96 h. This indicates the abortive nature of influenza infection in THP-PMA Mf. Thus, MF performs a special function of depositing viral components and delivering them to the sites of inflammation. The blocking mechanism in human and avian influenza A viruses with different pathogenicity may differ, due to the existence of multiple mechanisms of escape from the immune response. As a result of infection with the human virus A(H1N1)pdm09, the infection developed slowly and caused death of 25% of the cells by 72 h, whereas in the case of infection with avian viruses, 50% of the cells died after 24 hours and by 72 h all the THP-PMA MF died. Preprocessing with recombinant IFN α 2b had a protective effect, suppressing the accumulation of the NP protein of the A/H5N2 virus in the THP-PMA Mf nuclei. The obtained data allow us to conclude that one of the reasons for the different course and outcome of influenza infection in human infection with influenza A viruses is the sensitivity of human macrophages to avian influenza viruses of subtypes H5 and H9 as compared to the pandemic virus. Our result on the THP-PMA Mf model is consistent with reports on the blocking of the stages of the release of infectious influenza A virions in primary cultures of monocytic and alveolar MF. Massive death of MF caused by avian influenza viruses explains their high pathogenicity.

Key words: *infection, influenza A viruses, THP-PMA macrophages, cytopathogenic effect, intracellular level, viral RNAs, NP proteins.*

Вирусы гриппа A(H1N1) вызвали крупные пандемии 1918 и 2009 гг., вирусы гриппа птиц подтипов H5, H7 и H9 становились причиной спорадических случаев заболеваний у людей с высокой смертностью среди населения в разных странах мира, начиная с 90-х гг. [26]. Человеческие и птичьи вирусы гриппа имеют разную рецепторную специфичность. Большинство высокопатогенных птичьих вирусов, включая выделенные от человека, связываются с клеточными рецепторами «птичьего» типа (Neu5Ac α 2-3Gal), но не связываются с рецепторами «человеческого» типа (Neu5Ac α 2-6Gal). Эти различия служат основным объяснением ограниченной трансмиссии вирусов гриппа птиц к человеку. Дополнительно на макрофагах (Мф) и дендритных клетках (Дк) есть специализированные рецепторы семейства CRLs (C-type lectin receptor), используемые вирусами гриппа для усиления проникновения внутрь клеток [16]. В чувствительных эпителиальных клетках вирусы гриппа А вызывают высокопродуктивную инфекцию с освобождением инфекционного вируса [18]. Эффективность развития гриппозной инфекции в клетках иммунной системы Мф и Дк может быть различной, и причина различий остается предметом дискуссий.

По данным ряда исследователей вирусы гриппа А(H1N1) и А(H3N2) (сезонные и пандемические варианты) вызывают в человеческих Мф, произошедших из моноцитов периферической крови (ММФ), и в альвеолярных Мф (АМФ)

преимущественно abortивную инфекцию, хотя некоторые высокопатогенные штаммы H5N1 способны давать инфекционное потомство [20, 27]. Стадии, на которых прерывается вирусная инфекция в Мф, а также механизмы, участвующие в рестрикции, точно не определены. Тем не менее, зараженные вирусами гриппа клетки вызывают дифференцировку моноцитов в Мф [24]. Клетки THP-1 представляют удобную модель для изучения действия вирусов на иммунную систему, так как моноциты периферической крови и тканевые макрофаги трудно получить в количествах, необходимых для масштабных экспериментов [9]. Нами для изучения развития гриппозной инфекции, использованы THP-1 моноциты, дифференцированные фоболовым эфиром (PMA) в Мф (THP-PMA Мф). Процесс дифференцировки влияет на чувствительность моноцитов и макрофагов к вирусам гриппа [13, 24]. По свойствам THP-PMA Мф похожи на первичные моноцитарные Мф (ММф), полученные из клеток крови доноров [10]. Цель работы состояла в сравнительном анализе развития гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа А разных подтипов, а также в оценке цитопатического действия пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа птиц А(H5N2) и А(H9N2) на макрофаги. Для этого изучали динамику экспрессии гена М1 и белка NP в клетках THP-PMA Мф, зараженных человеческим и птичьими вирусами гриппа А с разными подтипами гемагглютининов (H1, H5 и H9).

Материалы и методы

Вирусы. Штаммы вирусов гриппа А/IV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 [3]; А/Mallard/Pennsylvania/10218/84-МА(H5N2) [21] и А/Swine/Hong Kong/9/98-МА(H9N2) [15] с разной антигенной и рецепторной специфичностью [7] получены из лаборатории физиологии вирусов Подразделения «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Вирусы были размножены в 10-дневных куриных эмбрионах и исследованы на инфекционную, антигенную, рецепторсвязывающую и гемагглютинирующую активности (табл. 1). Вирусы хранили при -80°C в аликвотах по 0,5 мл.

Клетки ТНР-1, выделенные от больного с острым моноцитарным лейкозом (АТСС Т1В-202) [23], получены из коллекции клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Ранее эта клеточная линия охарактеризована нами в отношении уровней экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов и представленности в популяции CD-фенотипов [5]. Количество и жизнеспособность клеток определяли в тесте исключения красителя с помощью трипанового синего. Подсчет клеток проводили в автоматическом счетчике клеток (BioRad TC-20). Суспензию клеток ТНР-1 пересевали с концентрацией 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с глутамином, 10% эмбриональной сывороткой телят и антибиотиками в пластиковых матрицах 25 см² (Costar, США). Изображения живых клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Olympus (Япония) при увеличении $\times 400$.

Обработка клеток ТНР-1 для получения макрофагов. ТНР-1 клетки были дифференцированы в макрофаги добавлением 50–100 нг/мл phorbol-12-myristate 13-acetate (РМА, P1585, Sigma-Aldrich, США) в течение 5 дней согласно [10] и обозначены как ТНР-РМА Мф.

Заражение вирусами гриппа А ТНР-РМА макрофагов. Аллантаоисные варианты вирусов, приготовленные в 10-дневных куриных эмбрионах, разводили в среде RPMI-1640 до концентрации 64 ГА/мл и добавляли к адгезивным культурам Мф (адсорбция 1 ч при 37°C). Несвязанный с клетками вирус дважды отмывали. К контрольным клеткам образцы вирусов не добавляли. Обработку препаратом рекомбинантного

IFN α 2 (Реаферон-ЕС липинт) 5×10^4 ед/мл проводили в течение 1 ч при 37°C до заражения вирусом H5N2, затем интерферон удаляли.

Зараженные и контрольные клетки инкубировали в среде RPMI-1640 без сыворотки с добавлением трипсина-TPCK (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) в течение 24, 48, 72 и 96 ч при 37°C . В динамике инфекции в культуральной жидкости определяли инфекционную и гемагглютинирующую активности. В клетках оценивали развитие цитопатогенного действия (ЦПД).

Титрование инфекционности вирусов гриппа проводили на чувствительных клетках CaCo-2 (АТСС США, приготовленные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина) микрометодом в 96-луночных планшетах [14]. Делали 4-кратные разведения вирусосодержащих культуральных жидкостей (ВКЖ), собранных в динамике инфекции — через 24, 48 и 72 ч. Пробы инкубировали с клетками без добавления трипсина-TPCK в атмосфере 5% CO₂. Результат цитопатического действия оценивали через 48 ч под световым микроскопом, определяя концентрацию, при которой погибали 50% клеток (TCID₅₀), и выражали величиной обратного разведения ВКЖ.

Реакция гемагглютинации куриных эритроцитов. К 2-кратным разведениям культуральных вирусов в круглодонных микроплатах добавляли на 30 мин 0,75% взвесь куриных эритроцитов в физиологическом растворе NaCl при pH 7,0. Результат учитывали визуально стандартным методом.

Выделение вирусных РНК. Суммарную РНК выделяли из контрольных и зараженных вирусами клеток, лизированных реагентом PureZol (Bio-Rad, США, Cat#732-6890) согласно инструкции производителя. ДНК удаляли ДНК-азой с помощью набора «RNA-free» (Ambion, США). На матрице РНК получали кДНК в объеме 30 мкл в реакции обратной транскрипции (ОТ) со случайными праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5x буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, США).

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученную кДНК в разведении 1/3 и 1/6 тестировали в количественной ПЦР с парами специфических олигонуклеотидных праймеров. Использовали 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени.

Таблица 1. Свойства вирусов гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9

Table 1. Properties of influenza A viruses of subtypes H1, H5 and H9

Штаммы вирусов гриппа А* Strains influenza A virus*	Адаптация к мышам Adaptation to mice	Тип рецептора Receptor's type	Титр ГА/TCID ₅₀ ** Titer HA/TCID ₅₀ **	Ссылки References
H1N1/Moscow/IV01/2009	–	α 2,6-gal	256/256	[7]
H5N2/Mallard/Pennsylvania/10218/84-МА	+	α 2,3-gal	512/256	[1, 21]
H9N2/Swine/Hong Kong/9/98-МА	+	α 2,3-gal	1024/1024	[19]

Примечания. *Вирусы получены размножением в 10-дневных куриных эмбрионах; **инфекционный титр TCID₅₀ в клетках CaCo-2.

Notes. *Viruses are obtained by multiplying in 10-day embryonated chicken eggs; **infectious titer of TCID₅₀ in CaCo-2 cells.

Протокол ПЦР: 96°C 2 мин, далее 55 циклов 94°C, 10 с, 50–54°C 20 с, 72°C 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флюоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка уровней экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме с определением средних значений и стандартных отклонений в повторных образцах. В конечной точке ПЦР устанавливали специфичность ДНК-амплификатов по температурным пикам плавления и размерам ПЦР-продуктов (электрофорез в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием).

ПЦР-праймеры к консервативному 7 сегменту РНК (ген М1) вирусов гриппа А описаны в литературе [11] и использованы в настоящей работе. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия). М1-праймеры дают специфические ДНК-продукты размером 245 п.н. с исследованными человеческими и птичьими вирусами гриппа А.

Иммунофлюоресцентный анализ белка NP вируса гриппа А. Макрофаг-подобные клетки ТНР-1 выращивали в присутствии РМА в концентрации 50 нг/мл в течение 5 дней на стеклах с полилизинном при 37°C в ростовой среде RPM1-1640 в атмосфере 5% CO₂. Опытные варианты заражали вирусами гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9 как описано выше, контрольные оставляли незараженными. После инкубации 24 ч при 37°C в питательной среде RPM1-1640 стекла с клетками тщательно отмывали в 0,1М фосфатном буфере (ФБ) и подсушивали. Клетки последовательно фиксировали в холодных 96% этаноле и ацетоне по 5 мин. Клетки блокировали от неспецифического связывания 2% БСА в 0,1 М ФБ и затем на них наносили специфические мышиные моноклональные антитела (МКА7F5, изотип IgG2, разведение 1/100) к NP вируса гриппа Н1N1 на 30 мин при 37°C [2]. Клетки, отмытые от NP-МКА раствором ФБ, инкубировали с антимышиными FITC-мечеными МКА (IgG2 Alexa Fluor-488, разведение 1/100, Invitrogen, США), 30 мин при 20°C. Для окраски клеточных ядер использован Hoechst 33258 (Sigma, США) в разведении 1/100. После каждого этапа окраски клетки трехкратно отмывали. Препараты анализировали с использованием флюоресцентного микроскопа Axio Scope (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 200 раз.

Результаты

Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на ТНР-РМА макрофаги. В ТНР-РМА Мф, зараженных птичьими вирусами гриппа А (Н5N2) и А(Н9N2) в дозе 64 ГА ед/мл, через 24 ч наблюдались внутриклеточные гранулы (выраженная зернистость) и другие признаки цитопатогенного действия (ЦПД) — изменение размеров, формы клеток и проницаемости мембраны. ЦПД виру-

са А(Н1N1)pdm09 развивалось медленно, и через 24 ч инфекции этим вирусом морфология зараженных Мф не отличалась от контроля (рис. 1).

При многоциклового гриппозной инфекции в среду культивирования добавляли протеазный ингибитор ТРСК — трипсин в дозе 1,2 мкг/мл. ЦПД птичьих вирусов было максимальным к 72 ч, когда гибель клеток достигала 100%, ЦПД человеческого вируса было значительно слабее: к 96 ч инфекции гибель составляла 50% (табл. 2).

В культуральной жидкости ТНР-РМА Мф, зараженных 3-мя исследованными вирусами гриппа, инфекционная активность не обнаружена на всех сроках инфекции 24–96 ч (< 4 ед TCID₅₀ в клетках Сасо-2). Реакция ГА с куриными эритроцитами также дала отрицательный результат (< 2 ГА ед/мл).

Уровни экспрессии РНК вирусов гриппа в ТНР-РМА макрофагах. Изучение внутриклеточных уровней РНК вирусов гриппа Н1N1, Н5N2 и Н9N2 с праймерами к гену М1 показало (рис. 2А), что уровни вирусных РНК-М1 в Мф высокие и существенно не изменяются в динамике инфекции. Результаты электрофореза в 1,5% агарозном геле подтверждают специфичность полученных ПЦР-продуктов генов М1 вирусов подтипов Н1, Н5 и Н9 (рис. 2Б). Уровни содержания РНК-М1 птичьих вирусов Н9N2 и Н5N2 (Cq16-19) оказались значительно выше, чем человеческого Н1N1pdm (Cq 26-29). Расчет уровней РНК вирусов в динамике инфекции показывает, что накопление птичьих вирусов Н9N2 и Н5N2 происходит быстрее относительно РНК вируса Н1N1pdm (табл. 3). Проникшие вирусные РНК длительно (по крайней мере в течение 3 сут) сохраняются в Мф.

Выявление NP-белков вирусов гриппа в ТНР-РМА макрофагах. Результаты исследования методом иммунофлюоресценции белка NP в ТНР-РМА Мф через 24 ч после заражения вирусами подтипов Н1, Н5 и Н9 приведены на рис. 3 (III обложка). Использовали моноклональные антитела МКА7F5 к консервативному участку белка NP вирусов гриппа А [2]. В контрольных ТНР-РМА Мф белок NP не выявлялся. В Мф, зараженных пандемическим вирусом Н1N1, выявлены единичные клетки с NP белком (зеленый) среди множества клеток, не содержащих белок и идентифицированных по окраске ядер Hoechst 33258.

Иная картина наблюдалась в Мф, зараженных вирусом Н5N2. На фоне выраженной клеточной деструкции, вызванной вирусом Н5N2, в большинстве неразрушенных клеток была обнаружена метка, свидетельствующая о локализации вирусного белка NP в цитоплазме и в ядрах. Обработка Мф IFNα2 в дозе 5 × 10⁴ МЕ/мл за 1 ч до заражения вирусом Н5N2 снижала число клеток с NP белком до единичных. При этом в обработанных IFN зараженных клетках наблюдался антивирусный эффект, который проявлялся заметным снижением ко-

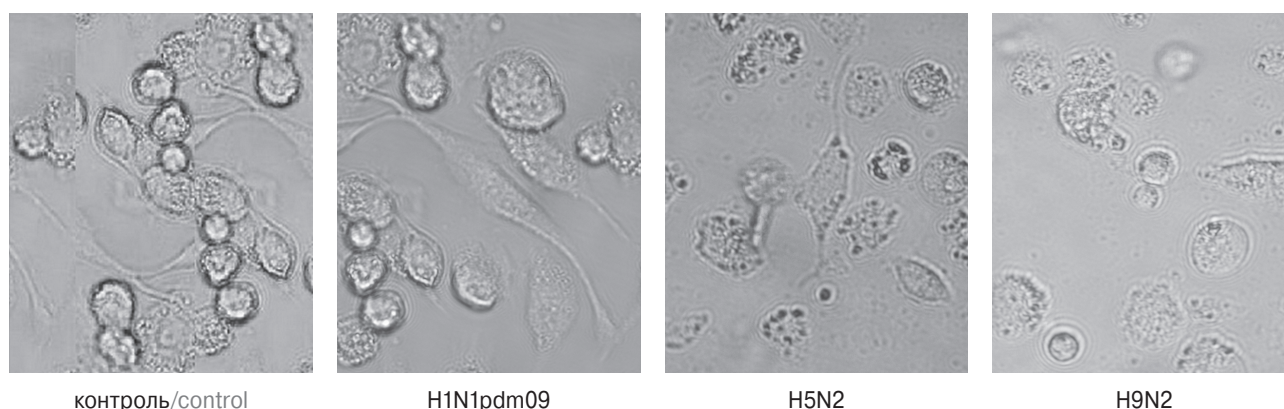


Рисунок 1. Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на клетки ТНР-РМА. Мф через 24 ч после заражения

Figure 1. The cytopathogenic effect of influenza A viruses in THP-1 macrophages 24 h after infection

личества клеток с вирусным NP-белком в цитоплазме и в ядрах. Антивирусный эффект IFN проявлялся также в значительном увеличении количества жизнеспособных клеток с нормальной морфологией.

В ТНР-РМА Мф, зараженных вирусом H9N2, белок NP выявлялся несколько слабее (по интенсивности флуоресценции), чем в зараженных вирусом H5N2. Ранее было показано, что МКА 7F5 активно взаимодействуют в ИФА с широким набором вирусов гриппа А человека и животных различных подтипов [2], но с вирусом подтипа H9 не были изучены. Возможно, полученные результаты могут объясняться меньшей аффинностью взаимодействия МКА 7F5 с NP вируса гриппа А подтипа H9 по сравнению с другими изученными подтипами вируса А. Не исключено также, что эпитоп, с которым взаимодействует МКА 7F5, по-разному экспонирован на белке NP вируса H9N2 и 2-х других исследованных вирусов гриппа.

Обсуждение

Для анализа развития гриппозной инфекции в настоящей работе применена клеточная модель ТНР-РМА макрофагов, которая по характеристикам напоминает активированные моноцитарные макрофаги из периферической крови типа M1 [10]. В активированных ТНР-РМА Мф нами ранее показаны высокие уровни

экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов и продукции воспалительных цитокинов, что указывает на существенную роль Мф в иммунных реакциях на вирусные патогены. Под действием РМА суспензионная культура ТНР-1 моноцитов приобретает адгезивные свойства, макрофаг-подобную морфологию и фенотип макрофагов M1 [10]. Механизмы активации моноцитов и их дифференцировки связаны с активацией группы киназ, прежде всего протеинкиназы С, а также AMPK и Syk [8, 22]. Наши исследования в ТНР-РМА Мф с вирусами гриппа А подтипов H1, H5 H9 с рецепторной специфичностью «человеческого» (Neu5Acα2-6Gal) и «птичьего» (Neu5Acα2-3Gal) типов показали, что инфекция имеет абортный характер и не сопровождается выходом из клеток инфекционных вирионов вплоть до 96 ч (время наблюдения). Полученный результат на модели ТНР-РМА Мф согласуется с сообщениями о блокировании этапов высвобождения инфекционных вирионов гриппа А в первичных культурах моноцитарных (ММф) и альвеолярных (АМф) макрофагов [17, 20, 25]. Латентная форма инфекции наблюдалась и в культурах моноцитов ТНР-1 и U-937 при низкой множественности инфекции вирусами гриппа H3N2 (Брисбен 10/07) и H1N1pdm09 (Санкт-Петербург, 2009) [4]. По мнению ряда исследователей наиболее вероятная стадия блока репликации птичьих вирусов гриппа в ММф и АМф — сборка вирионов [17, 20, 25].

Таблица 2. Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на ТНР-РМА макрофаги

Table 2. Cytopathogenic effect of influenza A viruses on THP-1 macrophages

Название штаммов вирусов гриппа А Name of strains of influenza A viruses	Доза заражения, ГА ед. Dose infection, HA unit	Цитопатический эффект*/Cytopathic effect*			
		24 ч/24 h	48 ч/48 h	72 ч/72 h	96 ч/96 h
Контроль клеток/Cell Control	0	0	0	0	0
H1N1/Moscow/IIV01/2009	64	0	25	25	50
H5N2/Mallard/Pennsylvania/10218/84	64	50	75	100	100
H9N2/Swine/HongKong/9/98	64	50	75	100	100

Примечание. *Процент нежизнеспособных клеток к общему количеству клеток.
Note. *Percent of not viable cells to the total cell number.

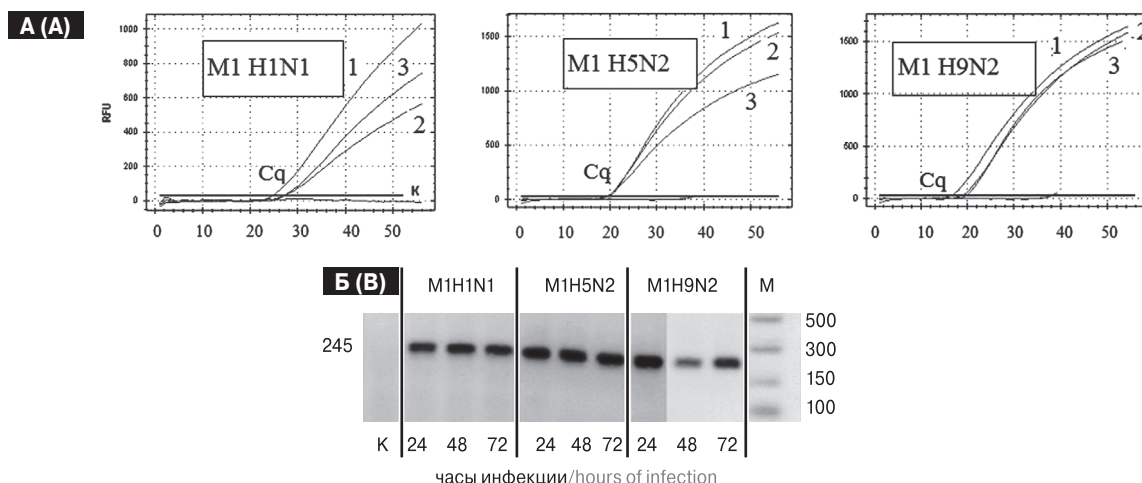


Рисунок 2. Внутриклеточные уровни вирусных РНК М1 в ТНР-РМА макрофагах в динамике инфекции

Figure 2. Intracellular levels of viral RNA M1 in THP-PMA macrophages in the course of infection

А) ОТ-ПЦР РНК-М1. Сроки инфекции: 24 ч (1), 48 ч (2), 72 ч (3). Б) электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Размер специфического ДНК-амплификата 245 п.н., М — маркеры молекулярной массы.

A) RT-PCR RNA M1. Infection time is 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3). B) electrophoresis of PCR products in a 1.5% agarose gel with ethidium bromide. The size of the specific DNA amplificate is 245 bp, M — markers of molecular weight.

Блокирующий механизм у вирусов гриппа А с разной патогенностью может различаться вследствие существования многообразных механизмов ускользания от иммунного ответа [18].

Важно отметить различия в abortивном течении инфекции пандемическим H1N1 (2009 г.) и птичьими вирусами H5N2 и H9N2. Вирусы отличаются уровнями проникновения и экспрессии вирусной РНК (ген М1) и белка нуклеокапсида (NP). Птичьи вирусы с подтипами гемагглютининов H5N2 и H9N2 эффективно взаимодействуют с активированными Мф и вызывают в них быстрое цитодеструктивное действие. Человеческий вирус H1N1pdm09 проникает в такие Мф медленно и до 72 ч не вызывает гибели клеток. Предобработка ТНР-РМА Мф рекомбинантным IFN α 2 оказывает защитный эффект, подавляя накопление NP белка вируса H5N2 в ядрах Мф. По данным литературы

проникновение птичьих вирусов гриппа H5N2 и H9N2 связано не только с рецепторной активностью гемагглютинаина, но и с использованием ими дополнительных рецепторов, усиливающих связывание с Мф, а также эндоцитоза (С-тип лектины и Fc-иммуноглобулины) [12, 16]. Рекомбинантный пандемический вирус гриппа А(H1N1) с геном гемагглютинаина птичьего вируса H5N1, приобрел способность размножаться в Мф продуктивно [17].

Особый интерес представляет феномен длительного внутриклеточного присутствия вирусных РНК и ядерная локализация белка NP. Тем самым Мф выполняет особую функцию депонирования вирусных компонентов и доставки их в места воспаления [18]. Подобная картина с вирионными РНК вируса H5N1 и его эскейп-мутанта в динамике наблюдения описана нами ранее в лимфоцитах 2-х доноров [6]. Начиная с ранних сроков инфекции, в лимфоцитах выявлялись вирионные РНК ГА и их количество менялось незначительно до 48 ч. При этом в культуральной жидкости лимфоцитов ни гемагглютинирующей активности, ни инфекционного вируса не было обнаружено.

Полученные данные показали, что различное течение и исход гриппозной инфекции при заражении человека вирусом гриппа А подтипов H5 и H9 или вирусом гриппа А(H1N1)pdm09, является следствием быстрой и массивной гибели макрофагов человека при заражении вирусами гриппа птиц по сравнению с пандемическим вирусом. Необходимы дальнейшие исследования влияния вирусных нуклеиновых кислот и белков на иммунные функции Мф, которые позволят раскрыть молекулярные и клеточные механизмы регуляции гриппозной инфекции в иммунокомпетентных клетках.

Таблица 3. Относительные уровни РНК М1 в ТНР-РМА макрофагах в динамике инфекции вирусами гриппа А разных подтипов

Table 3. Relative levels of M1 RNA in THP-PMA macrophages in dynamics of infection with influenza A viruses of different subtypes

Вирусы гриппа А Influenza A viruses	deltaCq РНК-М1*/deltaCq RNA-М1*		
	24 ч/24 h	48 ч/48 h	72 ч/72 h
H1N1pdm*	1±0,8	2±1,5	16±1,7
H5N2	512±12	496±14	256±16
H9N2	4096±43	512±11	512±14

Примечание. *ДельтаCq±SD рассчитаны в программе «Gene expression manager CFX-96» относительно РНК М1 вируса А(H1N1)pdm09 в 3-х повторных образцах на сроке 24 ч после заражения.
Note. *DeltaCq±SD are calculated in the «Gene expression manager CFX-96» program relatively M1 RNA virus А(H1N1)pdm09 in 3 replicate samples at a time of 24 h after infection.

Список литературы/References

- Игнатъева А.В., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Куш А.А., Ильюшина Н.А., Каверин Н.В. Влияние аминокислотных замен в малой субъединице гемагглютинина вируса гриппа птиц H5N2 на селекцию мутантов, резистентных к нейтрализующим моноклональным антителам // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 2. С. 342–350. [Ignatieva A.V., Timofeeva T.A., Rudneva, I.A., Shilov A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Kusch A.A., Ilyshina N.A., Kaverin N.V. Effect of amino acid substitutions in the small subunit of the avian H5N2 influenza virus hemagglutinin on selection of the mutants, resistant to neutralizing monoclonal antibodies. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, vol. 49, no. 2, pp. 342–350. doi: 10.7868/S0026898415020044 (In Russ.)]
- Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А., Мукашева Е.А., Руднева И.А., Львов Д.К., Куш А.А. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/ИВ-Москва/01/2009 (H1N1) swl, обладающие вируснейтрализующей активностью // Вопросы вирусологии. 2011. Т. 56, № 3. С. 15–20. [Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., Mukasheva E.A., Rudneva I.A., L'vov D.K., Kushch A.A. Monoclonal antibodies with high neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2011, vol. 56, no. 3, pp. 15–20. (In Russ.)]
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Малышев Н.А., Дeryabin П.Г., Федякина И.Т., Садыкова Г.К., Усачев Е.В., Щелканов М.Ю., Шевченко Е.С., Трушаклова С.В., Иванова В.Т., Белякова Н.В., Оскерко Т.А., Алипер Т.И. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма А/ИВ-Москва/01/09 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу А(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве // Вопросы вирусологии. 2009. Т. 54, № 5. С. 10–14. [L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Malyshev N.A., Deryakina I.T., Sadykova G.K., Usachev E.V., Shchelkanov M.Yu., Shevchenko E.S., Trushakova S.V., Ivanova V.T., Belyakova N.V., Oskerko T.A., Aliper T.I. The 24 May, 2009 isolation of the first A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl strain similar to swine A(H1N1) influenza virus from the first Moscow case detected on May 21, 2009, and its deposit in the State Collection of Viruses (SCV No. 2452 dated May 24, 2009). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2009, vol. 54, no. 5, pp. 10–14. (In Russ.)]
- Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Ильинская Е.В., Смирнова С.С., Еропкин М.Ю. Влияние заражения вирусом гриппа А при различной множественности инфекции на пролиферацию и индукцию апоптоза перевиваемых клеток лимфоцитарного и моноцитарного происхождения (Jurkat, NC-37, ТНР-1, U-937) // Цитология. 2015. Т. 57, № 7. С. 527–532. [Smirnova T.D., Danilenko D.M., Ilyinskaya E.V., Smirnova S.S., Eroptkin M.Yu. Impact of various multiplicity of infection of influenza A virus on proliferation and apoptosis induction in cultured cell lines of lymphocytic and monocytic origin (JURKAT, NC-37, TNP-1 and U-937). *Tsitologiya = Cytology*, 2015, vol. 57, no. 7, pp. 527–532. (In Russ.)]
- Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116 // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15, № 3. С. 28–33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLR genes expression and differentiation of tumor cell lines TNP-1 and HCT-116. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2016, vol. 15, no. 3, pp. 28–33. doi: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33 (In Russ.)]
- Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Ершов Ф.И. Рекомбинантный птичий вирус гриппа H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его «эскейп» мутант m13(13) индуцируют в лимфоцитах человека ранние сигнальные реакции иммунитета // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61, № 1. С. 22–26. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Ershov F.I. Avian recombinant virus H5N1 influenza(A/Vietnam/1203/04) and its “escape” mutant m13(13) induce early signaling reactions of immunity in human lymphocytes. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 22–26. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26 (In Russ.)]
- Тимофеева Т.А., Игнатъева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин И.В., Каверин Р.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецептор связывающую активность гемагглютинина вирусов гриппа А подтипов H1 и H5 // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 1. С. 24–27. [Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Rudneva I.A., Mochlova L.V., Bovin N.V., Kaverin N.V. Effect of mutations changing the antigenic specificity on the receptor-binding activity of the influenza virus hemagglutinin of H1 and H5. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 24–27. (In Russ.)]
- Chang M.-Y., Huang D.-Y., Ho F.M., Huang K.-C., Lin W.-W. PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 7:e40999. doi: 10.1371/journal.pone.0040999
- Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. TNP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, vol. 23, no. 1, pp. 37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
- Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated TNP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 2010, vol. 9, no. 1:e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
- Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herfst S., van der Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 11, pp. 4096–4101.
- Goffard A., Alidjinou E.K., Sané F., Choteau L., Bouquillon C., Caloone D., Lobert P.E., Hober D. Antibodies enhance the infection of phorbol-ester-differentiated human monocyte-like cells with coxsackievirus B4. *Microbes Infect.*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 18–27. doi: 10.1016/j.micinf.2012.10.005
- Hoeve M.A., Nash A.A., Jackson D., Randall R.E., Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 1:e29443. doi: 10.1371/journal.pone.0029443
- Jahangir A., Ruenphet S., Hara K., Shoham D., Sultana N., Okamura M., Nakamura M., Takehara K. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. *J. Virol. Meth.*, 2010, vol. 169, iss. 1, pp. 232–238. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.023

15. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Lipatov A.S., Krauss S., Webster R.G. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 1, pp. 240–249. doi: 10.1128/JVI.78.1.240-249.2004
16. Londrigan S.L., Tate M.D., Brooks A.G., Reading P.C. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, vol. 92, iss. 1, pp. 97–106. doi: 10.1189/jlb.1011492
17. Marvin S.A., Russier M., Huerta C.T., Russell C.J., Schultz-Cherry S. Influenza overcomes cellular blocks to productively replicate impacting macrophage function. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 2:e01417-16. doi: 10.1128/JVI.01417-16
18. Pulendran B., Maddur M.S. Innate immune sensing and response to influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 386, pp. 23–71. doi: 10.1007/82_2014_405
19. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Ilyushina N.A. Effects of hemagglutinin amino acid substitutions in H9 influenza A virus escape mutants. *Arch. Virol.*, 2016, vol. 161, iss. 12, pp. 3515–3520. doi: 10.1007/s00705-016-3038-x
20. Short K.R., Brooks A.G., Reading P.C., Londrigan S.L. The fate of influenza A virus infection of human macrophages and dendritic cells. *J. Gen. Virol.*, 2012, vol. 93, pp. 2315–2325. doi: 10.1099/vir.0.045021-0
21. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Van Beek R., Gitelman A.K., Osterhaus A.D., Claas E.C. Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to mammalian host. *Acta Virol.*, 2000, vol. 44, no. 1, pp. 1–8.
22. Sumiya Y., Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. Macrophage activation mechanisms in human monocytic cell line-derived macrophages. *Anticancer Res.*, 2015, vol. 35, no. 8, pp. 4447–4451.
23. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 1980, vol. 26, no. 2, pp. 171–176.
24. Uchida N., Ohya K., Yuan B., Bessho T., Yamakawa T. Differentiation of monocytes to macrophages induced influenza virus infected apoptotic cells. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, iss. 4, pp. 747–751. doi: 10.1099/0022-1317-83-4-747
25. Van Riel D., Leijten L.M., van der Eerden M., Hoogsteden H.C., Boven L.A., Lambrecht B.N., Osterhaus A.D., Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 6:e1002099. doi: 10.1371/journal.ppat.1002099
26. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2014, vol. 1323, iss. 1, pp. 115–139. doi: 0.1111/nyas.12462
27. Yu W.C.L., Chan R.W.Y., Wang J., Traventy E.A., Nichoilis J.M., Peiris J.S., Mason R.J., Chan M.C.W. Viral replication and innate host response in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 14, pp. 6844–6855. doi: 10.1128/JVI.02200-10

Авторы:

Соколова Т.М., академик РАЕН, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Полосков В.В., научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Шувалов А.Н., к.м.н., научный сотрудник лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Руднева И.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Тимофеева Т.А., к.б.н., руководитель лаборатории физиологии вирусов, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Климова Р.Р., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Масалова О.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Куц А.А., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Sokolova T.M., RANS Full Member, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Poloskov V.V., Researcher, Laboratory of Cytokines, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Shuvalov A.N., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Ontogenesis and Correction of the Interferon System, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Rudneva I.A., PhD (Biology), Leading Researcher, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Timofeeva T.A., PhD (Biology), Head of Laboratory of Physiology of Viruses, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Klimova R.R., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Masalova O.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kushch A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
Отправлена на доработку 23.01.2018
Принята к печати 27.02.2017

Received 11.07.2017
Revision received 23.01.2018
Accepted 27.02.2017

ОСОБЕННОСТИ β -ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СРЕДНЕАЗИАТСКОГО ПОДВИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

И.В. Бахтеева, Т.Б. Кравченко, А.К. Рябко, Г.М. Титарева, И.О. Лев, А.Н. Мокриевич, В.С. Тимофеев

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия

Резюме. Возбудителем туляремии является мелкая грамотрицательная бактерия *Francisella tularensis*. Этот вид делится на четыре подвида: ssp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*, которые различаются по географическому ареалу распространения, вирулентности и эпидемиологическому потенциалу. До недавнего времени на территории РФ выявлялся только подвид *holarctica*. Однако в 2013 г. на Алтае был обнаружен природный очаг туляремии, в котором циркулируют штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, выделяемые ранее только в Средней Азии. Данные лабораторных исследований свидетельствуют о способности штаммов этого подвида вызвать инфекцию у кроликов и мышей, сравнимую по тяжести с инфекцией, вызываемой штаммами голарктического подвида. Однако вирулентность и эпидемическая опасность среднеазиатского подвида *F. tularensis* для человека до сих пор остается неопределенной, так как случаев туляремии у человека, вызванных штаммами этого подвида, не было зарегистрировано, что может быть связано с особенностями его географического распространения — и Средняя Азия, и Горный Алтай являются крайне редконаселенными регионами. Основным фенотипическим признаком этого подвида является отсутствие активности фермента β -лактамазы, отвечающего за природную устойчивость к β -лактамам антибиотикам (пеницилинам, цефалоспорином и карбапенемам). При этом, несмотря на отсутствие детектируемой ферментативной активности, штаммы среднеазиатского подвида сохраняют устойчивость к этим антибиотикам. В настоящей статье мы приводим данные о том, что штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, вопреки общепринятым представлениям, обладают β -лактамазной активностью, но при этом скорость гидролиза β -лактамов значительно снижена по сравнению со штаммами подвида *holarctica*. Кроме того, при снижении количества микробных клеток в питательной среде начинает проявляться и антибиотикочувствительность. Мы выявили единственную подвидоспецифичную для subsp. *mediasiatica* нуклеотидную замену G/A в 290 положении гена *blaB*, кодирующего активную сериновую β -лактамазу. Эта замена приводит к аминокислотной замене Gly на Arg в 97 положении белка BlaB. Мы полагаем, что данная замена является наиболее вероятной причиной снижения активности этого фермента, обуславливая возможные конформационные изменения, приводящие либо к снижению сродства фермента к субстрату, либо к увеличению времени существования фермент-субстратного комплекса. Выявленная замена послужила основой для разработки аллель-специфичного ПЦР-теста, позволяющего определить принадлежность исследуемого штамма *F. tularensis* к подвиду *mediasiatica*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, среднеазиатский подвид, β -лактамазная активность, антибиотикоустойчивость, гены β -лактамаз, генетическое разнообразие.

Адрес для переписки:

Бахтеева Ирина Викторовна
142279, Россия, Московская область, Серпуховский район,
п. Оболensk, ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии
и биотехнологии.
Тел.: 8 (926) 478-37-54.
E-mail: bahteeva@obolensk.org

Contacts:

Bakhteeva V. Irina
142279, Russian Federation, Moscow region, Serpukhov district,
Obolensk, State Research Center for Applied Microbiology and
Biotechnology.
Phone: +7 (926) 478-37-54.
E-mail: bahteeva@obolensk.org

Библиографическое описание:

Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Рябко А.К., Титарева Г.М., Лев И.О., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С. Особенности β -лактамазной активности среднеазиатского подвида туляремиийного микроба // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 33–42. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42

Citation:

Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., Titareva G.M., Lev I.O., Mokrievich A.N., Timofeev V.S. Features of beta-lactamase activity in *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 33–42. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-33-42

FEATURES OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY IN *FRANCISELLA TULARENSIS* subsp. *MEDIASIATICA*

Bakhteeva I.V., Kravchenko T.B., Ryabko A.K., Titareva G.M., Lev I.O., Mokrievich A.N., Timofeev V.S.

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

Abstract. Small Gram-negative bacteria *Francisella tularensis* is the tularemia causative agent. This species subdivides on four subspecies — ssp. *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* and *novicida*, which have some differences in their distribution areas, pathogenicity and epidemical potential. Until recently only subspecies *holarctica* was found on the territory of the Russian Federation, but in 2013 a natural focus of tularemia in which circulates *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* was found on the Altai. Till now this subspecies was found only in Central Asia. The data of laboratory studies indicate the ability of strains of this subspecies to cause infection in rabbits and mice which is comparable in severity to infection caused by subsp. *holarctica* strains. However, the virulence of *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* for humans and its epidemical potential are still unclear, since no cases of human infection caused by the strains of this subspecies have been recorded, probably due to the geographical aspects — mountainous Altai and Central Asia are extremely sparsely populated regions. The main phenotypic feature of this subspecies is the lack of activity of β -lactamase, which is responsible for the natural resistance to β -lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins and carbapenems). Despite the absence of detectable enzymatic activity, subsp. *mediasiatica* strains are resistant to these antibiotics. In this article we report that subsp. *mediasiatica* strains have β -lactamase activity despite to current opinion, but the of β -lactams hydrolysis rate is much more lower in comparison with reaction rate of subs. *holarctica* strains. In addition, in case of a decrease of the microbial cells number in the nutrient medium, antibiotic susceptibility appears. We identified a single specific for subsp. *mediasiatica* nucleotide substitution G/A at the 290 position of the *blaB* gene, which encodes the active serine β -lactamase. This substitution leads to the amino acid substitution Gly/Arg at the 97 position of the protein BlaB. We assume, that enzymatic activity decreasing is the most likely caused by this substitution), for example it may cause some conformational changes leading either to enzyme — substrate affinity decreasing or to in the lifetime of the enzyme-substrate complex increasing. On the basis of the found nucleotide substitution, we developed an allele-specific PCR test that makes it possible to determine whether the studied strain *F. tularensis* belongs to the subspecies *mediasiatica*.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies *mediasiatica*, β -lactamase activity, antibiotic resistance, genes of β -lactamase, genetic diversity.

Введение

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, имеет внутривидовое разделение на 4 подвида, различающихся ареалами распространения, степенью патогенности и эпидемической значимостью [11], поэтому подвидовая идентификация культур *F. tularensis* является важным этапом диагностики туляремийной инфекции, обеспечивая предварительную оценку вирулентности и эпидемиологической опасности. До недавнего времени на территории РФ выявлялся в основном подвид *holarctica*, однако в 2013 г. на Алтае был обнаружен природный очаг туляремии, в котором циркулируют штаммы *F. tularensis*, относящиеся к среднеазиатскому подвиду (*mediasiatica*) [2]. Вирулентность и эпидемическая опасность среднеазиатского подвида *F. tularensis* для человека до сих пор остается terra incognita, так как случаев туляремии у человека, вызванных штаммами этого подвида, не было зарегистрировано. Вполне вероятно, что это связано с ареалом его распространения — в малонаселенных районах Средней Азии с низкоэффективным медицинским обслуживанием. Немногочисленные опубликованные данные лабораторных исследований свидетельствуют о его способности вызвать инфекцию у кроликов и мышей [18]. Эксперименты, проводимые в нашей лаборатории (данные не опубликованы), свидетельствуют о том, что его вирулентность для мышей сходна с вирулентностью подвида *holarctica*. Основным диагностическим признаком *F. tularensis* subsp.

mediasiatica является отсутствие β -лактамазной активности, отвечающей за природную устойчивость туляремийного микроба к антибиотикам β -лактаманного ряда [4, 5].

Для туляремийного микроба характерна природная резистентность к β -лактамам [3, 6], и в ряде работ были охарактеризованы гены β -лактамаз *F. tularensis*, а также показано, что лишь один из этих генов *blaB* кодирует функционально активный белок FTU-1, обеспечивающий резистентность к ампициллину [7, 8, 14]. Аналоги FTU-1 были обнаружены у всех четырех подвида туляремийного микроба, включая *F. tularensis* подвида *mediasiatica*. β -лактамазная активность регистрируется как в тесте чувствительности к антибиотикам, так и в колориметрическом тесте с хромогенным субстратом нитроцефином [15, 17]. В работе М.В. Цимбалистовой и Н.В. Павлович штаммы *F. tularensis* разных подвида демонстрировали в диско-диффузионном тесте высокую резистентность к антибиотикам группы пенициллинов вне зависимости от подвидовой принадлежности и β -лактамазной активности в тесте с нитроцефином [5]. Таким образом, по данным литературы [4, 5], у штаммов туляремийного микроба среднеазиатского подвида, обладающих резистентностью к пенициллинам и имеющих в своем геноме ген активной сериновой лактамазы FTU-1, не выявляется β -лактамазная активность, определяемая в колориметрическом тесте.

Наличие функционально активной β -лактамазы согласуется с устойчивостью штаммов

среднеазиатского подвида к пенициллинам, но вступает в противоречие с отсутствием β-лактамазной активности. Поиск причин этого противоречия послужил основанием для выполнения данного исследования. В данной работе мы приводим результаты сравнительного изучения кинетических характеристик β-лактамазной активности штаммов *F. tularensis* разных подвидов и вариабельности генетических детерминант, обуславливающих β-лактамазную активность *F. tularensis*. Частично результаты данной работы были доложены на II Национальном конгрессе бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (20–22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург).

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов, среды и условия культивирования. В работе использовали 29 природных штаммов *F. tularensis* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (26 — подвида *mediasiatica*, 2 — подвида *holarctica* и один штамм — подвида *tularensis*). Кроме того, в ряде экспериментов использовали полученные с помощью гомологичной рекомбинации варианты штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ ssp. *holarctica* с инактивированными β-лактамазами (для получения штамма 15Δ123, чувствительного к β-лактамам) и штамма 120 ssp. *mediasiatica* с инактивированным геном *pur* (для получения аттенуированного штамма 120Δ*pur*). Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37°C на плотной питательной среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) и в жидкой питательной среде [2] с добавлением полимиксина В до концентрации 100 мг/л.

Анализ *in silico*. Поиск нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с использованием баз данных, доступных на информационном портале NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Множественное выравнивание нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов, расчет их температур плавления, трансляция *in silico*, анализ расположения на хромосоме исследуемых генов и их гомологов, а также их фрагментов проводились с помощью пакета программ Vector NTI 10.0.1. (Invitrogen Corporation).

Выделение нуклеиновых кислот из бактерий проводили с помощью набора реагентов Gen-Elute™ Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкциям производителя.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы биотехнологической компанией «Синтол» (Москва, Россия).

Алель-специфическая ПЦР (AS-ПЦР). Анализ нуклеотидной замены в гене *blaV* осуществляли

с помощью AS-ПЦР по схеме, предложенной Birdsell [9]. Учет результатов AS-ПЦР проводили в реальном времени по анализу кривых плавления в амплификаторе с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США) с использованием «2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-PB в присутствии красителя SYBR Green I» (Синтол, Россия, Москва). Интенсивность SYBR Green-флуоресценции измеряли при длине волны 530 нм. Детекцию продуктов амплификации проводили с использованием оптического ПЦР-модуля по каналу FAM/SYBR.

Определение устойчивости к антибиотикам диско-диффузионным методом. Из суточной агаровой культуры *F. tularensis* готовили миллиардную микробную взвесь в забуференном физиологическом растворе с использованием стандарта мутности ОСО. На поверхность чашек с подсушенным FT-агаром наносили 1 мл взвеси, посредством покачивания чашки культуру равномерно распределяли по поверхности среды, подсушивали и затем на поверхность среды накладывали стандартные диски с антибиотиками (OXOID, Великобритания). Через 24 ч измеряли диаметр зоны торможения роста бактериальной культуры вокруг соответствующих дисков с антибиотиками (включая диаметр диска).

Определение устойчивости к антибиотикам методом серийных разведений. В 96-луночных планшетах готовили двукратные разведения антибиотиков в жидкой питательной среде для туляремиального микроба [1] в объеме 100 мкл. Бактериальные суспензии использовали в конечных концентрациях от 2×10^3 до 2×10^8 м.к./мл, антибиотики от 0,05 до 10 000 мг/л.

Бактерицидный эффект антибиотика определяли через 48 ч с помощью колориметрического теста МТТ [12]. Для этого во все лунки 96-луночного планшета добавляли по 10 мкл раствора МТТ в забуференном физиологическом растворе (5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4–6 ч при температуре 37°C, затем содержимое лунок растворяли добавлением 50 мкл 10%-ного раствора додецилсульфата натрия, приготовленного на 0,01 М соляной кислоте, и измеряли оптическую плотность полученного лизата при длине волны 595 с использованием спектрофотометра Ultrospec 3100 pro (Pharmacia, США). Бактерицидный эффект учитывали либо по минимальной бактерицидной концентрации (по лункам со 100% гибелью микроорганизмов), либо по проценту живых клеток по формуле $OD_{595_{аб}}/OD_{595_{контроль}} \times 100$.

Истощение пула пенициллина в жидкой питательной среде в присутствии бактериальных клеток *F. tularensis*. В жидкую питательную среду, содержащую 400 мкг/мл пенициллина, вносили бактериальные суспензии сравниваемых штаммов *F. tularensis* и культивировали в течение 24 ч. Остаточное количество антибиотика в супер-

натанте измеряли через 4 и 24 ч по способности супернатанта ингибировать рост контрольного чувствительного к пенициллину штамма *F. tularensis* 15 Δ123 с инактивированными β-лактамазами. В качестве контроля антибиотика использовали двукратные разведения пенициллина в питательной среде, начиная с 400 мкг/мл. Определяли титр супернатанта, при котором рост чувствительного штамма не ингибировался, и по нему рассчитывали остаточное количество антибиотика в супернатанте

Подготовка проб для определения бета-лактамазной активности. Суспензии *F. tularensis* подвергали деструкции обработкой ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора (Cole-Parmer, США) при мощности 150 Вт дробно в течение 60 с. Полученные пробы осветляли центрифугированием при 13 000 об./мин и супернатанты ультразвуковых лизатов (УЗЛ) использовали для дальнейшей работы.

Кинетические параметры β-лактамазной активности культур *F. tularensis* определяли на спектрофотометре Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader (LabSystems, США), в качестве субстрата использовали хромогенный цефалоспирин нитроцефин с концентрацией 500 мкг/мл, гидролиз которого приводит к образованию окрашенного продукта, количество которого прямо пропорционально уровню β-лактамазной активности. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 495 нм при температуре 37°C после добавления нитроцефина в течение первого часа — каждые 15 мин, далее — каждый час в течение суток. Измерение удельной активности фермента и скорости ферментативной реакции проводили с использованием спектрофотометра Ultrospec 3100 pro (Pharmacia, США) и термостатируемой спектрофотометрической ячейки (Biochrom, США) как описано [10].

Результаты

Чувствительность *F. tularensis* разных подвидов к антибиотикам группы бета-лактамов

Известно, что штаммы туляремийного микроба среднеазиатского подвида, в отличие от subsp. *tularensis* и *holarctica*, не обладают пенициллазной активностью, определяемой в тесте с феноловым красным или нитроцефином [4, 5], хотя и имеют в своем геноме ген сериновой лактамазы FTU-1, ответственной за устойчивость к пенициллинам [7]. Используя диско-диффузионный метод, мы определили чувствительность к β-лактамам антибиотикам у 12 штаммов *F. tularensis* различных подвидов из коллекции ГНЦ ПМБ. Результаты экспериментов приведены в таблице 1.

Из данных таблицы видно, что штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* ничем не отличались от штаммов других подвидов по уровню рези-

стентности к β-лактамам. Полученные результаты соотносятся с данными М.В. Цимбалистовой и Н.В. Павлович [5], согласно которым штаммы *F. tularensis* среднеазиатского подвида резистентны к β-лактамам антибиотикам в диско-диффузионном тесте.

Однако использование метода стандартных разведений позволило выяснить, что устойчивость к ампициллину у штамма среднеазиатского подвида *F. tularensis* 120Δpur значительно различается в зависимости от его концентрации: когда концентрация микробной взвеси снижалась до 10⁶ м.к./мл, штамм *F. tularensis* 120Δpur демонстрировал значительное повышение чувствительности к ампициллину по сравнению с референсным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Используя десятикратные разведения микробной суспензии в присутствии антибиотика, мы определили минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ампициллина для разных концентраций бактериальных клеток *F. tularensis* 120Δpur (табл. 2).

Для штамма 15 голарктического подвида МБК ампициллина составляла 2048 мкг/мл и не менялась при снижении концентрации до 10⁵ м.к./мл. Для штамма 120Δpur МБК ампициллина при снижении концентрации бактериальных клеток до 10⁶ м.к./мл снизилась в 256 раз.

В последующих экспериментах мы установили, что штамм 120Δpur при концентрации микробных клеток ниже 10⁶ м.к./мл приобретает чувствительность к антибиотикам группы пенициллинов, но не других групп β-лактамов (цефалоспоринов и карбопенемов) (табл. 3).

Истощение пула пенициллина в жидкой питательной среде в присутствии бактериальных клеток штамма 15 НИИЭГ голарктического подвида и штамма 120Δpur среднеазиатского подвида

Для сравнения способности бактериальных клеток *F. tularensis* разных подвидов к гидролизу пенициллина были поставлены эксперименты по истощению пенициллина в жидкой питательной среде в результате культивирования в ней клеток *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *mediasiatica* (табл. 4).

Четырехчасовое культивирование штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в среде с пенициллином в течение 4 ч снижало концентрацию антибиотика в 250 раз, штамм 120Δpur — в 2 раза. Однако последующее 24-часовое культивирование штамма 120Δpur subsp. *mediasiatica* приводило к снижению концентрации антибиотика в 125 раз (табл. 4). Таким образом, бактериальные клетки *F. tularensis* 120 Δpur в течение суток утилизировали примерно столько же пенициллина, сколько клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ subsp. *holarctica* гидролизировали за 4 ч культивирования.

Таблица 1. Чувствительность штаммов *F. tularensis* разных подвигов к антибиотикам группы бета-лактамов*Table 1. Susceptibility of *F. tularensis* subspecies to antibiotics of the beta-lactam group*

Подвид Subspecies	Штаммы Strains	Пенициллины Penicillins		Карбапенемы Carbapenems			Цефалоспорины Cephalosporins						
		Ампициллин Ampicillin	Амоксициллин Amoxicillin	Меропенем Meropenem	Имипенем Imipenem	Эртапенем Ertapenem	Цефтазидим Ceftazidime	Цефотаксим Cefotaxime	Цефуроксим Cefuroxime	Цефазолин Cephazolin	Цефтриаксон Ceftriaxone	Цефепим Cefepime	Цефокситин Cefoxitin
<i>tularensis</i>	Schu	0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0
<i>holarctica</i>	503	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
	A-79	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	0
	X-3	0	0	11	26	28	37	0	0	0	0	0	11
	A-1045	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0
<i>mediasiatica</i>	A-823	13	0	0	24	25	0	32	0	0	0	0	20
	A-554	0	0	0	18	11	0	30	0	0	0	0	30
	678	0	0	0	16	0	0	0	0	48	0	0	0
	120	0	0	0	18	15	0	0	0	0	0	0	0
	120Δpur	0	11	0	25	18	0	0	0	0	10	0	13

Примечания. *Диаметр (мм) зоны ингибирования микробного роста *F. tularensis* в диско-диффузионном тесте (включая диаметр диска — 6 мм). **Значение 0 мм обозначает отсутствие зоны ингибирования роста микроорганизма вокруг диска.

Notes. *The growth inhibition zone (mm) in the disc-diffusion test (including the diameter of the disc — 6 mm). **The value of 0 mm indicates that there is no zone of inhibition of microorganism growth around the disk.

Динамика β-лактамазной активности штаммов *F. tularensis* 120Δpur subsp. mediasiatica и 15 НИИЭГ subsp. holarctica

Динамику β-лактамазной активности двух исследуемых штаммов *F. tularensis* — 120Δpur subsp. mediasiatica и 15 НИИЭГ subsp. holarctica — определяли в течение суток в нитроцефиновом тесте. Динамику оценивали как в живых микробных культурах *F. tularensis*, так и в соответствующих осветленных ультразвуковых лизатах (УЗЛ). В качестве отрицательного контроля использовали безлактамазный вариант штамма 15 НИИЭГ — 15Δbla123.

В качестве одной из кинетических характеристик β-лактамазной активности использовали оптическую плотность (OD) раствора, как показатель общего количества продукта гидролиза нитроцефина (рис. 1).

Как видно из рис. 1, β-лактамазная активность регистрировалась как у штамма голарктического подвида 15 НИИЭГ, так и, в меньшей степени, у штамма среднеазиатского подвида 120Δpur. При этом характер кривых накопления продукта расщепления нитроцефина двух сравниваемых штаммов различен. В пробах, содержащих *F. tularensis* голарктического подвида, отмечается выраженный пик накопления продукта расщепления нитроцефина через 4–6 ч культивирования, в то время как для штамма среднеазиатского подвида характерно медленное нарастание количества продукта гидролиза нитроцефина в течение всего периода наблюдения (24 ч).

В качестве косвенного показателя скорости расщепления нитроцефина мы в течение суток определяли скорость изменения оптической плотности реакционной смеси в единицу времени (ΔOD) (рис. 2).

Из диаграммы на рисунке 2 видно, что основная часть нитроцефина расщепляется клетками *F. tularensis* 15 НИИЭГ подвида *holarctica* в течение первого часа реакции. В осветленных лизатах изменение оптической плотности реакционной смеси в первый час реакции достигало

Таблица 2. Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur к ампициллинуTable 2. The susceptibility of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur strains to ampicillin

Концентрация бактериальных клеток/мл Bacterial cells concentration per ml	МБК, мкг/мл (диапазон)* MBC, μg/ml (range)*	
	15 НИИЭГ 15 NIEG	120Δpur
10 ⁸	> 2048	> 2048
10 ⁷	> 2048	> 2048
10 ⁶	> 2048	8
10 ⁵	256–1024	2
10 ⁴	32	0,125
10 ³	2	0,125

Примечание. *Представлены значения МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Note. *There indicated results of MBC measurement in two independent experiments, in each of which each sample was placed in three replicates.

Таблица 3. Чувствительность штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur к β-лактамам*
Table 3. The susceptibility of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur to β-lactams*

Антибиотик Antibiotic	МБК, мг/л (диапазон)** MBC, mg/L (range)	
	15 НИИЭГ	120Δpur
Ампициллин/Ampicillin	256–1024	2
Амоксициллин/Amoxicillin	512	4–8
Пенициллин/Penicillin	32–64	4
Цефазолин/Cefazolin	64–128	256
Цефтриаксон/Ceftriaxon	2–4	2
Имипенем/Imipenem	32	16
Меропенем/Meropenem	4	8–64

Примечания. *Величина МБК определена для микробной взвеси с концентрацией 10⁵ м.к./мл. **Представлены значения МБК в двух независимых экспериментах, каждая проба в каждом эксперименте была поставлена в трех повторах.

Notes. *Minimal bactericidal concentration (MBC) was determined for bacterial suspension 10⁵ CFU/ml. **There indicated results of MBC measurement in two independent experiments, in each of which each sample was placed in three replicates.

1,3 единиц. Уже на второй час скорость расщепления нитроцефина падала до 0,2–0,3 единиц оптической плотности за час, а через 6 ч снижалась до уровня фоновых колебаний оптической плотности контрольной среды.

Скорость расщепления нитроцефина клетками штамма *F. tularensis* 120Δpur среднеазиатского подвида была намного ниже — в осветленных

Таблица 4. Реципрокные титры пенициллина в жидкой питательной среде, определенные после культивирования в ней *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur*

Table 4. Reciprocal penicillin titres in a liquid nutrient medium determined after growing of the *F. tularensis* strains 15 NIEG and 120Δpur*

Штаммы <i>F. tularensis</i> <i>F. tularensis</i> strains	Время культивирования с пенициллином, ч Growing time with penicillin, h	Реципрокные титры Reciprocal titres
15 НИИЭГ	4	16
120Δpur	4	1024
120Δpur	24	32
Нет No	0 (control of penicillin)	2048

Примечание. *Титр определяли методом стандартных разведений на культуре чувствительного к пенициллину штамма *F. tularensis* 15Δbla123. Указано последнее разведение, при котором отсутствовал видимый рост соответствующего штамма при концентрации микроорганизмов 10⁵ КОЕ/мл. Истощение пенициллина проводили путем 4- или 24-часового культивирования культур *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 120Δpur в среде с пенициллином 400 мкг/мл.

Note. *The titers were determined using penicillin-sensitive *F. tularensis* strain 15Δbla123 in standard tenfold dilutions. The last dilution in which there was no visible growth of 10⁵ CFU/ml indicated in the table. Penicillin depletion was performed by cultivation of *F. tularensis* 15 NIEG and 120Δpur during 4 or 24 hours in the presence of penicillin (400 μg/ml).

УЗД изменение оптической плотности за час составляло от 0,17 до 0,11 единиц, но при этом скорость расщепления субстрата держалась выше фоновых изменений оптической плотности среды в течение 16 ч.

Следует отметить, что осветленные клеточные лизаты демонстрировали более высокие значения оптической плотности и большую скорость расщепления нитроцефина по сравнению с суспензиями живых микробных клеток.

Мы определили максимальную скорость гидролиза субстрата, обеспечиваемого β-лактамазами в составе УЗЛ штаммов *F. tularensis*, и удельную активность УЗЛ штаммов в расчете на мг общего белка. Для штамма *F. tularensis* голактического подвида 15 НИИЭГ эти показатели составили 0,2275 ΔА/мин и 2,8261 ΔА/мин, а для штамма среднеазиатского подвида 120Δpur — 0,0007 ΔА/мин и 0,0086 ΔА/мин соответственно. Таким образом, относительная скорость реакции гидролиза β-лактамов для штамма 120Δpur составила 0,3% от скорости расщепления нитроцефина клетками *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Полученные данные свидетельствуют о том, что активность фермента лактамазы в штамме среднеазиатского подвида 120Δpur снижена не менее чем на два порядка по сравнению со штаммом голактического подвида 15 НИИЭГ.

Поиск генетических маркеров гена *blaB* *F. tularensis*, специфичных для подвида *mediasiatica*

Для изучения вариабельности генетических детерминант, обуславливающих β-лактамазную активность *F. tularensis* мы провели *in silico* анализ гена *blaB* (FTL_0879), кодирующего сериновую лактамазу BlaB (Bla2, FTU-1, YP_513599.1) (рис. 3).

Подвидоспецифические отличия *F. tularensis* среднеазиатского подвида ограничивались единичной нуклеотидной заменой гуанина на аденин (рис. 3А), и, как следствие, одной аминокислотой заменой в 97 положении — глицина на аргинин (рис. 3Б).

Подвидоспецифичность этой замены мы проверили на 17 штаммах среднеазиатского подвида, имеющих в нашей коллекции. Для этого мы воспользовались методом аллель-специфической (AS) ПЦР. Аллель-специфическая ПЦР осуществляется за счет двух AS-прямых праймеров, которые конкурируют за связывание с матрицей, и одного общего обратного праймера. При этом 3'-концевой нуклеотид каждого из прямых праймеров комплементарен одному из двух аллельных состояний изучаемого гена. При таком условии идеально совпадающий с матрицей праймер вытесняет из реакции несовпадающий из-за большей эффективности реакции.

Мы разработали пару AS-праймеров, которая позволила нам успешно определять методом AS-PCR нуклеотидную замену в гене

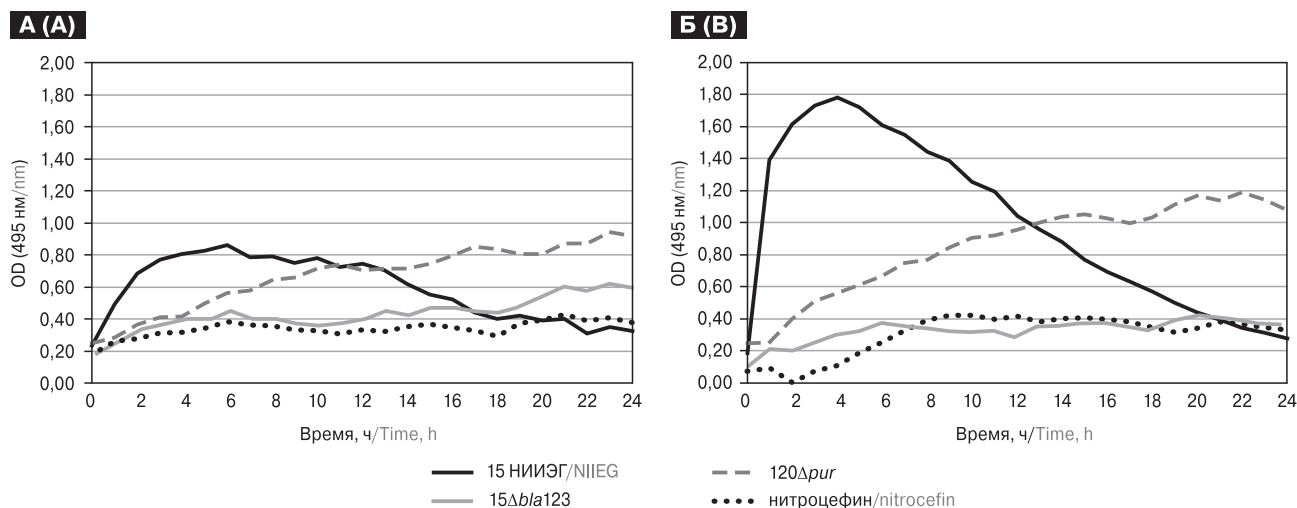


Рисунок 1. Динамика расщепления нитроцефина клетками *F. tularensis*

Figure 1. Dynamics of nitrocefina hydrolysis by *F. tularensis* cells

А) Живые культуры *F. tularensis*. Б) Осветленные УЗЛ живых культур *F. tularensis*. Оптическая плотность раствора отражает накопление продукта распада нитроцефина.

A) *F. tularensis* live cultures. B) Live cultures of *F. tularensis* clarified by ultrasound. The optical density (OD) of the solution represents the accumulation of the decomposition product of nitrocefina.

blaB, специфичную для среднеазиатского подвида *F. tularensis*: FA (forward ancestor) — ATCAAGATGATATTGGTAAACGCA; FD (forward derived) — cggggcgggcgggcgggcATCAAGATGATATTGGTAAACCCG; R (reverse) — CATCAGCAGTAATTATAGTATCGTTATCACC. Подчеркиванием обозначены аллель-специфичные нуклеотиды, жирным шрифтом — дестабилизирующие замены, строчными буквами — GC-последовательность, предназначенная для идентификации продукта реакции. Праймер

ФА является аллель-специфичным для подвида *mediasiatica F. tularensis*, праймер FD — для подвигов *tularensis*, *holarctica* и *novicida*. Специфичность реакции была повышена за счет включения в последовательность праймеров дополнительной точечной дестабилизирующей замены основания на некомплементарное в (–3) положении с 3'-конца обоих форвардных праймеров. Такой методический подход, называемый анализом амплификации с несоответствием — mismatch amplification mutation assay (Melt-MAMA), уве-

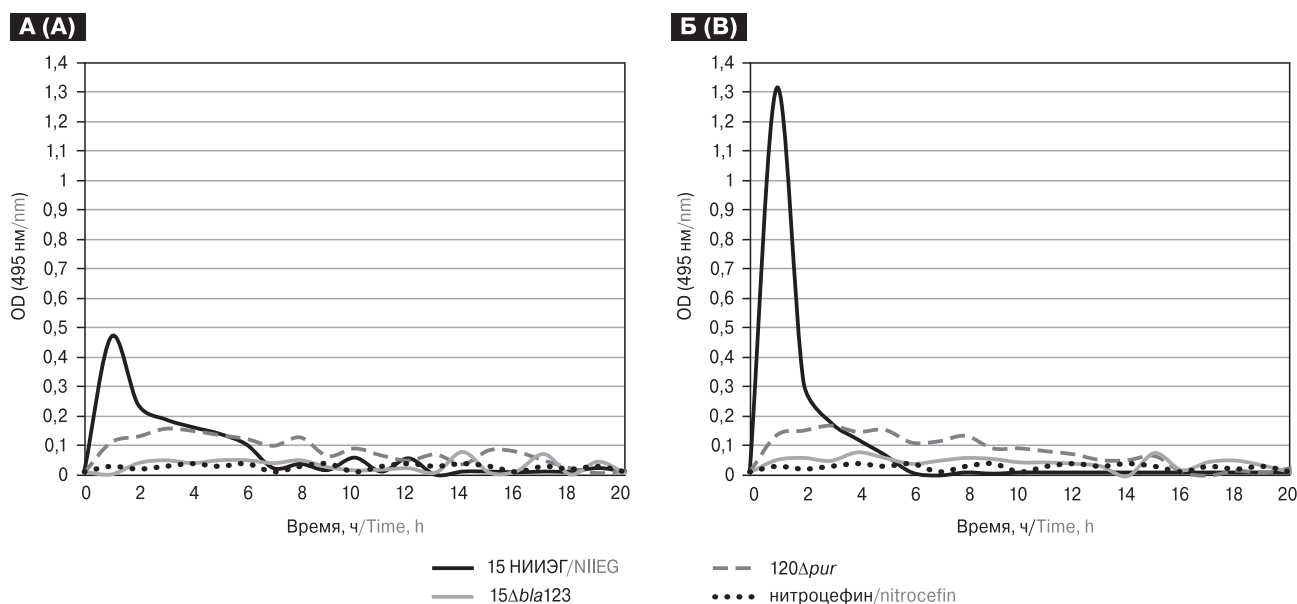


Рисунок 2. Изменение оптической плотности реакционной смеси в единицу времени (ΔOD)

Figure 2. Change in the optical density of the reaction mixture per unit time (ΔOD)

А) Живые культуры *F. tularensis*. Б) Осветленные УЗЛ живых культур *F. tularensis*.

A) Live cultures *F. tularensis*. B) Live cultures of *F. tularensis* clarified by ultrasound.



Рисунок 3. Множественное выравнивание нуклеотидных (А) и аминокислотных (Б) последовательностей β-лактамазы Bla2

Figure 3. Multiple alignment of nucleotide (A) and amino acid (B) sequences of β-lactamase Bla2

Штаммы *F. tularensis* подвидов: *mediasiatica* — FSC 147; *tularensis* — Schu S4, WY96-3418; *holarctica* — LVS, Osu 18; *novicida* — U 112.

Strains *F. tularensis* subspecies: *mediasiatica* — FSC 147; *tularensis* — Schu S4, WY96-3418; *holarctica* — LVS, Osu 18; *novicida* — U 112.

личивает преимущественную амплификацию фрагмента ДНК с того из прямых праймеров, чей 3'-концевой нуклеотид комплементарен детектируемому аллельному состоянию матрицы [9].

Мечение одного из AS-праймеров (FD) GC-последовательностью позволило нам увеличить размер получаемого с него ампликона, что, в свою очередь, дало возможность дифференцировать продукты AS-ПЦР в реальном времени с помощью анализа кривых их плавления.

На рисунке 4 представлены кривые плавления продуктов ампликации ДНК 8 штаммов туляремийного микроба, 3 из которых принадлежат к подвидам *holarctica* (15 НИИЭГ), *tularensis* (SCHU S4) и *novicida* (U 112), а пять — к подвиду *mediasiatica*.

На диаграмме кривых плавления видно, что амплификаты делятся на две группы, одна из которых имеет кривую плавления с максимумом 80°C, другая — 82°C. Большой температурный максимум кривой плавления продукта ампликации соответствует большему размеру ампликона, то есть ампликону, меченному GC-последовательностью. Соответственно, амплификаты, имеющие максимум 80°C, получены с праймера FA, специфичного для аллеля A/T. В свою очередь, амплификаты, имеющие максимум 82°C, получены с праймера FD, специфичного для аллеля G/C. К первой группе принадлежат все пять штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, ко второй — штаммы всех остальных подвидов. Аналогичные результаты были получены для всех 17-ти штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, использованных в данном исследовании.

Обсуждение

Определение кинетических характеристик β-лактамазной активности *F. tularensis* по накоплению продукта расщепления нитроцефина

и скорости его гидролиза показало, что штамм *F. tularensis* 120Δ*pur* среднеазиатского подвида, вопреки современным представлениям специалистов по туляремии, обладает β-лактамазной активностью, но при этом скорость гидролиза нитроцефина клетками этого штамма на порядки снижена по сравнению со штаммом *F. tularensis* голарктического подвида 15 НИИЭГ. Об этом же свидетельствуют результаты теста по истощению пенициллина в питательной среде — культуры как штамма голарктического подвида, так и среднеазиатского подвида значительно снижали концентрацию пенициллина в среде — в 250 и 125 раз соответственно, однако в первом случае это происходило в течение 4 ч, во втором — в течение суток.

С результатами кинетических исследований согласуется тот факт, что снижение концентрации микробных клеток *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120Δ*pur* в питательной среде с антибиотиками группы пенициллинов приводит к появлению у них антибиотикочувствительности. По всей видимости, в условиях сниженной эффективности работы β-лактамаз удельная концентрация антибиотика на одну бактериальную клетку приобретает решающее значение. Именно поэтому при определении чувствительности к β-лактамам антибиотикам диско-диффузионным методом при использовании рекомендованных высоких концентраций микробных суспензий (10⁸–10⁹ м.к./мл) различий в уровнях резистентности штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* от штаммов других подвидов не было выявлено. Полученные нами результаты согласуются с недавними исследованиями М.В. Цимбалюкова и Н.В. Павлович [6]. Мы показали, что снижение концентрации бактериальных клеток *F. tularensis* подвида *mediasiatica* до 10⁵ м.к./мл и соответствующее увеличение нагрузки молекул антибиотика на клеточную стен-

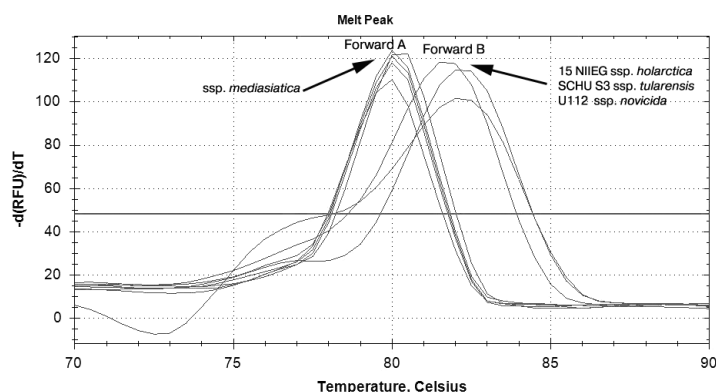


Рисунок 4. Кривые плавления, полученные в результате аллель-специфической ПЦР с ДНК-матрицей штаммов *F. tularensis* разных подвидов, с использованием пары конкурирующих праймеров FA и FD

Figure 4. Melting curves obtained as a result of allele-specific PCR with the DNA matrix of *F. tularensis* strains of different subspecies, using a pair of competing primers FA and FD

Примечание. Приведены данные одного репрезентативного эксперимента.

Note. The data of one representative experiment are presented.

ку одной микробной клетки приводит к декомпенсации ее β-лактамазного механизма и реализации бактерицидного эффекта антибиотика.

Следует отметить, что диагностическая ценность цветного нитроцефинового теста при подвидовой диагностике туляремии остается несомненной, позволяя дифференцировать штаммы *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* в первые часы исследования.

Исходя из того, что β-лактамазная активность осветленных ультразвуковых лизатов культур *F. tularensis* была выше таковой живых культур, можно предположить, что активная β-лактамаза *F. tularensis* расположена в периплазматическом пространстве, как у большинства грамотрицательных бактерий, и при лизисе высвобождается в окружающую среду. Данное предположение требует дальнейшего изучения путем выделения фермента непосредственно из периплазматического пространства и прямой оценки его активности.

С нашей точки зрения, выявленная нами *in silico* единичная аминокислотная замена Gly на Arg в 97 положении белка бета-лактамазы BlaB

в штамме *F. tularensis* FSC147 subsp. *mediasiatica* является вероятной причиной снижения активности этого фермента, обуславливая возможные конформационные изменения, приводящие либо к снижению сродства фермента к субстрату, либо к увеличению времени существования фермент-субстратного комплекса. Для окончательного ответа на этот вопрос требуются дальнейшие исследования с использованием методов генной инженерии.

Разработанная нами аллель-специфическая ПЦР позволила показать на панели из 17 штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, что замена G/A в 290 положении гена сериновой лактамазы *blaB* является специфичной для среднеазиатского подвида туляремийного микроба и может быть использована в качестве мишени для его ПЦР-идентификации.

Данная работа финансируется отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (2016–2020 гг).

Список литературы/References

1. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis* // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 4 (102). С. 66–67. [Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. Simple liquid nutrient medium for molecular genetic investigations of *Francisella tularensis*. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2009, no. 4 (102), pp. 66–67. (In Russ.)]
2. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 1. С. 66–69. [Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. Isolation of Central Asian subspecies of tularemia agent in the Altai territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2013, no. 1, pp. 66–69. doi: 10.21055/0370-1069-2013-1-66-69 (In Russ.)]
3. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975. 192 с. [Olsufyev N.G. *Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika возбуdivatelya tulyaremii* [Taxonomy, microbiology and laboratory diagnostics of the causative agent of tularemia]. Moscow: Medicine, 1975, 192 p.]

4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Фосфатазная и пенициллиназная активности как стабильные признаки для дифференциации расовой принадлежности *Francisella tularensis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1992. № 11–12. С. 5–7. [Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. Phosphatase and penicillinase activities as stable traits for the differentiation of the racial classification of *Francisella tularensis*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1992, no. 11–12, pp. 5–7. (In Russ.)]
5. Цимбалистова М.В., Павлович М.В. Особенности формирования устойчивости *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* к бета-лактамам антибиотикам // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 1. С. 3–8. [Tsimbalistova M.V., Pavlovich M.V. Features of the formation of resistance *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* to beta-lactam antibiotics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2014, no. 1, pp. 3–8. (In Russ.)]
6. Ambler R.P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1980, vol. 289, iss. 1036, pp. 321–331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049
7. Antunes N.T., Frase H., Tothet M., Vakulenko S.B. The class A β -lactamase FTU-1 is native to *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, vol. 56, no. 2, pp. 666–671. doi: 10.1128/AAC.05305-11
8. Bina X.R., Wang C., Miller M.A., Bina J.E. The Bla2 β -lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class β -lactam antibiotics. *Arch. Microbiol.*, 2006, vol. 186, no. 3, pp. 219–228. doi: 10.1007/s00203-006-0140-6
9. Birdsell D.N., Pearson T., Price E.P., Hornstra H.M., Nera R.D., Stone N., Gruendike J., Kaufman E.L., Pettus A.H., Hurbon A.N., Buchhagen J.L., Harms N.J., Chanturia G., Gyuranecz M., Wagner D.M., Keim P.S. Melt analysis of mismatch amplification mutation assays (Melt-MAMA): a functional study of a cost-effective SNP genotyping assay in bacterial models. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, iss. 3:e32866. doi: 10.1371/journal.pone.0032866
10. Bou G., Oliver A., Ojeda M., Monzon C., Martinez-Beltran J. Molecular characterization of FOX-4, a new AmpC-Type plasmid-mediated β -lactamase from an *Escherichia coli* strain isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, vol. 44, no. 9, pp. 2549–2553. doi:10.1128/AAC.44.9.2549-2553.2000
11. Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P., Kodira C.D., Borowsky M., Young S., Koehrsen M., Engels R., Pearson M., Howarth C., Larson L., White J., Alvarado L., Forsman M., Bearden S.W., Sjöstedt A., Titball R., Michell S.L., Birren B., Galagan J. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 5:e1000459. doi: 10.1371/journal.ppat.1000459
12. Grela E., Ząbek A., Grabowiecka A. Interferences in the optimization of the MTT assay for viability estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 159–167.
13. Kugeler K.J., Mead P.S., Janusz A.M., Staples J.E., Kubota K.A., Chalcraft L.G., Petersen J.M. Molecular epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, iss. 7, pp. 863–870. doi: 10.1086/597261
14. LoVullo E.D., Sherrill L.A., Perez L.L., Pavelka M.S. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Microbiology*, 2006, vol. 152, no. 11, pp. 3425–3435. doi: 10.1099/mic.0.29121-0
15. Montgomery K., Raymundo J.L., Drew W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 1979, vol. 92, no. 2, pp. 205–207.
16. Mörner T. The ecology of tularemia. *Rev. Sci. Tech.*, 1992, vol. 11, no. 4, pp. 1123–1130.
17. O'Callaghan C.H., Morris A., Kirby S.M., Shingler A.H. Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1972, vol. 1, pp. 283–288. doi: 10.1128/AAC.1.4.283
18. Olsufjev N.G., Meshcheryakova I.S. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 1983, vol. 33, no. 4, pp. 872–874. doi: 10.1099/00207713-33-4-872

Авторы:

Бахтеева И.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Кравченко Т.Б., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Рябко А.К., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Титарева Г.М., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Лев И.О., к.б.н., младший научный сотрудник отдела биотехнологии ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Мокриевич А.Н., д.м.н., зав. отделом особо опасных инфекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия;
Тимофеев В.С., к.б.н., зав. лабораторией микробиологии сибирской язвы ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Россия.

Authors:

Bakhteeva I.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Kravchenko T.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Ryabko A.K., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Titareva G.M., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Lev I.O., PhD (Biology), Junior Researcher, Department of Biotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Mokrievich A.N., PhD, MD (Medicine), Head of Department of Especially Dangerous Infection, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation;
Timofeev V.S., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
 Отправлена на доработку 23.01.2018
 Принята к печати 27.02.2017

Received 11.07.2017
 Revision received 23.01.2018
 Accepted 27.02.2017

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФОНЕ ТЕПЛООВОГО СТРЕССА

Н.Г. Плехова¹, Л.М. Сомова², Е.И. Дробот², А.В. Лагулева¹, И.Н. Ляпун²,
Н.М. Кондрашова¹, С.Д. Огнева¹

¹ ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия

Резюме. Поддержание термостатического гомеостаза обеспечивается интегративным взаимодействием различных систем организма, в том числе иммунной, при координирующем влиянии гипоталамуса. Температурный стресс при инфекционных заболеваниях активизирует реакцию теплового шока, биохимическим последствием которого является инициация защиты организма от возбудителя. Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы и макрофаги) являются первой линией защиты от патогенных агентов и играют первостепенную роль в развитии бактериальных инфекций. Определенный интерес представляет изучение длительности воздействия гипертермии для достижения баланса между биоэнергетическими затратами указанных клеток, а также исследование течения патологического процесса в организме, предварительно подвергнутого воздействию температуры. На модели животных, подвергнутых воздействию низкой (+4°C) и высокой (+30°C) температуры, изучено функциональное состояние нейтрофилов и макрофагов, включая фагоцитоз, активность ферментов кислородзависимой системы: лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, миелопероксидазы, показателя стимуляции клеток (внутриклеточное содержание АМФазы) и содержание метаболитов оксида азота. Установлено, что в условиях гипертермии, изменение функциональной активности клеток по уровню ферментов более выражено, чем при воздействии на животных низкой температуры, особенно при 4-часовом воздействии. У животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, проявления псевдотуберкулезной инфекции были более тяжелыми с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными, инфицированными *Yersinia pseudotuberculosis*. У этих животных в начальные сроки (до 7 сут) наблюдалась высокая стимуляция эффекторных клеток воспаления, усиливался их метаболизм, который выражался в повышении активности ферментов кислород-зависимой системы, а также в высокой нитроксидпродуцирующей активности. На фоне выраженного геморрагического компонента патологического процесса и слабой клеточной воспалительной реакции в органах мишенях, наблюдалось истощение компонентов иммунной системы (делимфатизация), что указывало на снижение защитных реакций организма и развитие иммунодефицита. Таким образом в условиях теплового стресса (+30°C), напряженность реакции клеток врожденного иммунитета по показателям функциональной активности (АМФазы, ЛДГ, ЦХО, МПО) была выше, чем при воздействии на животных низкой температуры (+4°C). В указанных температурных условиях определялся высокий уровень праймированности клеток, что снижало их киллинговый потенциал. Эти данные указывают на адек-

Адрес для переписки:

Плехова Наталья Геннадьевна
690002, Россия, Владивосток, пр. Острякова, 4,
ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.
Тел.: 8 (423) 242-97-78 (служебн.).
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Contacts:

Natalia G. Plekhova
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakova pr., 4,
Pacific State Medical University.
Phone: +7 (423) 242-97-78 (office).
E-mail: pl_nat@hotmail.com

Библиографическое описание:

Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Лагулева А.В., Ляпун И.Н., Кондрашова Н.М., Огнева С.Д. Функциональная активность клеток врожденного иммунитета при бактериальной инфекции на фоне теплового стресса // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 43–53. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-43-53

Citation:

Plekhova N.G., Somova L.M., Drobot E.I., Lagureva A.V., Lyapun I.N., Kondrashova N.M., Ogneva S.D. The functional activity of innate immunity cells in bacterial infection on background of thermal stress // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 43–53. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-43-53

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (гос. контракт № 14-33-00009) и Федерального агентства научных организаций.

ватность используемой модели с целью воспроизведения индуцированного вторичного иммунодефицита по системе врожденной защиты. Причем, в патогенезе псевдотуберкулезной инфекции на фоне пролонгированного действия высокой температуры обнаруживались последствия окислительного стресса фагоцитов в структурных изменениях иммунокомпетентных органов.

Ключевые слова: гипертермия, тепловой стресс, нейтрофилы, макрофаги, ферменты, *Yersinia pseudotuberculosis*.

THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNITY CELLS IN BACTERIAL INFECTION ON BACKGROUND OF THERMAL STRESS

Plekhova N.G.^a, Somova L.M.^b, Drobot E.I.^b, Lagureva A.V.^a, Lyapun I.N.^b, Kondrashova N.M.^a, Ogneva S.D.^a

^a Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Research Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Maintenance of thermo homeostasis under the coordinating influence of the hypothalamus is ensured by integrative interaction of various systems organism, including the immune system. Temperature stress in infectious diseases activates the reaction of heat shock, the biochemical consequence of which is the initiation of the organism's defense against the pathogen. Cells of innate immunity (neutrophils and macrophages) are the first line of protection against pathogenic agents and play a primary role in the development of bacterial infections. Of particular interest is the study of the duration of the effect of hyperthermia to achieve a balance between the bioenergetic costs of these cells, as well as the study of the course of the pathological process in an organism previously exposed to high temperature. The functional status of neutrophils and macrophages, including phagocytosis, the activity of enzymes of the oxygen-dependent system: lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase, myeloperoxidase, cellular stimulation (intracellular AMPase content) and the content of nitrogen oxide metabolites have been studied in the model of animals exposed to low and high temperatures. It has been established that under hyperthermia conditions, the change in the functional activity of cells by enzyme level is more pronounced than when exposed to animals with low temperature, especially 4 h exposure. In animals pre-exposed to heat stress, manifestations of pseudotuberculosis infection were more severe with an increase in mortality rates by 2.6 times, compared to animals infected by bacteria. These animals had a high stimulation of effector cells of inflammation in the initial periods (at 7 days) their metabolism was enhanced, which was expressed of the activity of enzymes of the oxygen-dependent system, as well as in high nitroxide-producing activity. In target organs (lung, liver, spleen) of experienced animals the severe disturbance of blood circulation in combination with significant destructive changes typical for generalized infection were showed. At dead animals on the background of marked hemorrhagic component pathological process and weak cell inflammatory response observed depletion of the immune system (delimphatization), indicating a decrease in defense reactions and the development of immunodeficiency. Thus, under conditions of heat stress (+30°C), the intensity of the reaction of innate immunity cells in terms of enzyme's functional activity was higher than when exposed to animals of low temperature (+4°C). Under these temperature conditions, a high level of cell priming was determined, which reduced their killing potential. These data indicate the adequacy of the model used to reproduce induced secondary immunodeficiency in a congenital defense system. Moreover, in the pathogenesis of pseudotuberculosis infection against the background of prolonged action high temperature, the effects of phagocytes oxidative stress in the structural changes of immunocompetent organs were detected.

Key words: low and high temperature, heat stress, neutrophils, macrophages, enzymes, *Yersinia pseudotuberculosis*.

Введение

Поддержание термостатического гомеостаза обеспечивается интегративным взаимодействием различных систем организма, в том числе иммунной, при координирующем влиянии гипоталамуса. При гипотермии снижается обмен веществ в клетках и тканях, уменьшается потребность организма в кислороде, что используется в медицинской практике для предупреждения временной ишемии мозга (гибернация). Применение гипертермии в качестве терапии (пиротерапия) при различных патологических состояниях организма обусловлено формированием высокочувствительных «контрольных точек», отвечающих за его терморегуляцию. Пиротерапия, искусственно вызванная лихо-

радка в диапазоне температур от 38,5 до 41,5°C, применяется как средство стимулирования противоопухолевой защиты организма [1, 6, 15]. Причиной применения пиротерапии послужили клинические наблюдения, свидетельствующие о более благоприятном течении и исходе некоторых инфекционных заболеваний на фоне высокой температуры [16], тогда как гипотермия негативно воздействует на защитные реакции организма [3]. Повышение температуры оказывает влияние на оксигенацию опухолевых клеток [22], инфильтрацию тканей опухоли специфическими цитотоксическими CD8⁺ Т-клетками [6, 7] и экспрессию клетками белков теплового шока [8]. Причем указывается, что температурный стресс при инфекционных заболеваниях активизирует реакцию теплового

шока, биохимическим последствием которого является инициация защиты организма от возбудителя [19].

Клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы и макрофаги) являются первой линией защиты от патогенных агентов, причем в последнее десятилетие существенно дополнено представление о их роли в развитии противoinфекционного ответа. Так, доказано опосредованное участие этих клеток в реализации защиты организма при экспрессии различных классов патоген-распознающих рецепторов (Toll-рецепторы, цитозольные рецепторы для ретиноевой кислоты [(RIG)-I-подобные] и нуклеотид-связывающих олигомеризированных доменовых [NOD-подобные]) [11, 12]. Степень экспрессии указанных рецепторов инициирует продукцию различных молекулярных компонентов как сигнальных внутриклеточных путей, так и межклеточного пространства [10, 22]. Также приводятся новые данные о разделении нейтрофилов и макрофагов на субпопуляции неактивированных и активированных клеток соответственно экспрессии рецепторов и функционального состояния [18]. С другой стороны, в проблеме резистентности организма к бактериальным инфекциям остается недостаточно изученным ряд вопросов, касающихся значимости ферментных систем клеток врожденного иммунитета и образования в них оксида азота. Активация цитозольных рецепторов и сопутствующие им конформационные изменения молекул, окружающие их, происходят при обязательном участии ферментов. На настоящий момент, механизмы влияния гипо- и гипертермии на клетки врожденного иммунитета остаются неясными, тогда как изменение температуры тела всего на 1°C влечет за собой метаболические затраты организма для поддержания его термостатического гомеостаза [5, 17]. Причем, определенный интерес представляет длительность воздействия гипертермии для достижения баланса между биоэнергетическими затратами клеток, связанными с терморегуляцией, а также течение патологического процесса в организме, предварительно подвергнутого воздействию температуры.

Цель исследования: в сравнительном аспекте изучить динамику показателей функциональной активности клеток врожденного иммунитета животных, подвергнутых воздействию высокой и низкой температур, и исследовать влияние общей гипертермии на патогенез инфекции, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на беспородных белых мышцах весом 18–20 г, которые были разделены на 5 групп: 1 группа — интактные животные (5 шт.); 2 группа — животные, подвергнутые воздействию низкой (+4°C) температуры в течение 1, 2, 3 и 4 ч (40 шт.); 3 группа — животные,

подвергнутые воздействию высокой температуры (+30°C) в течение 4-х ч (20 шт.); 4 группа — животные, зараженные *Y. pseudotuberculosis* (30 шт.); 5 группа — животные, подвергнутые однократному тепловому стрессу 4 ч при +30°C и зараженные *Y. pseudotuberculosis* (30 шт.). У последних 3-х групп активность клеток исследовалась в динамике через 1, 2, 3, 7, 14 и 21 сут после заражения. Все процедуры выполняли в соответствии с международными правилами обращения с животными (National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publications No. 80023, 1996).

Создание гипертермических условий осуществляли методом нагревания животных в течение 2, 3 и 4 ч в воздушном термостате при температуре +30°C с принудительной вентиляцией (объем рабочей камеры 0,064 м³) при относительной влажности воздуха 60–68%, атмосферном давлении 744–760 мм рт.ст., содержании O₂ и CO₂ соответственно 20,5 и 0,10%. Измерение температуры нагреваемых животных производилось ректальным ртутным термометром с ценой деления 0,1°C, затем производили отбор клеток из перитонеального экссудата. Аналогично проводили воздействие на животных низкой температуры +4°C.

За 18 ч до проведения эксперимента с целью получения популяции нейтрофилов и макрофагов вызывали асептическое воспаление путем введения стерильной 1% пептонной воды по 0,2 мл в перитонеальную полость, затем получали первичную культуру фагоцитов. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 кл/мл в среде 199 (ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН) с 10% сывороткой крови плодов коровы (НПО «Вектор», п. Кольцово), инактивированной при +50°C, содержащую 2 мМ глутамина, 0,2 мМ гентамицина и 100 ед/мл пенициллина. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии. Для культивирования макрофагов использовали среду 199, которая содержала эмбриональную сыворотку коровы (5%), 0,2 мМ антибиотика гентамицина (100 мг/мл) и пенициллина (100 ед/мл). Помимо выявления стартового потенциала фагоцитов определяли их резервные возможности путем дополнительной инкубации клеток с *Y. pseudotuberculosis* в течение 30 мин.

Методы оценки функциональной активности фагоцитов

Фагоцитарную активность клеток определяли, используя в качестве тест-бактерий свежие культуры описанных выше штаммов микроорганизмов. После 30 и 120 мин контакта фагоцитов с объектами фагоцитоза, пробы фиксировались для определения завершенности фагоцитоза. Препараты окрашивались 0,1% раствором азур-

эозина в течение 15 мин. Определяли следующие показатели фагоцитоза: фагоцитарный показатель (ФП) — процент клеток, фагоцитировавших бактерии, и фагоцитарное число (ФЧ) — среднее количество бактерий, поглощенных одним фагоцитом.

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл субстрата для ЛДГ — йоднитротетразолий (ЙНТ, *iodonitrotetrazolium violet*, ICN) 2 мг/мл на основе фосфатного буфера pH = 7,2 с 0,4% $MnCl_2$. Монослой клеток с субстратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0,04 М HCl, в течение 20 мин. Оптическая плотность субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовались образцы с раствором подкисленного изопропилового спирта без клеток.

Определение активности цитохромоксидазы (ЦХО). проводили по методу Novikoff и Goldfischer в собственной модификации. К фиксированному монослою фагоцитов добавляли 100 мкл 0,1 М ацетатного буфера (pH = 5,5), содержащего 10 мг/мл $MnCl_2$ и 0,33% перекиси водорода, и 2 мг/мл диаминобензидина (3,3'-diaminobenzidine, ICN). После инкубирования в течение 10 мин при комнатной температуре реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическая плотность полученных субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны 492 нм. В качестве контроля использовались образцы с растворами субстратов и 10% серной кислоты.

Определение активности миелопероксидазы (МПО). В лунки планшетов, к фиксированным клеткам вносили по 100 мкл ОФД (*o*-phenylenediamine, ICN) (4 мг на 10 мл) на основе фосфатно-цитратного буфера (pH = 5,0) с добавлением 500 мкл 0,33% перекиси водорода. Монослой клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем реакцию останавливали добавлением 10% раствора серной кислоты по 100 мкл на лунку. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре «Multiscan Titertek Plus» («Flow lab») при длине волны 492 нм. Бланкирование проводили по раствору ОФД и 10% серной кислоты.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции (Т), который вычисляли как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции клеток животных после воздействия температуры, и клеток от интактных животных, к среднему показателю оптической плотности раствора для клеток от интактных животных, в процентах.

Результаты

У животных после воздействия низкой (гипотермия) и высокой (гипертермия) температур определяли показатель стимуляции клеток (внутриклеточное содержание АМФазы — 5'-нуклеотидазы), активность ферментов кислородзависимой системы (ЛДГ, ЦХО, МПО), и в качестве показателя состояния нитроксидзависимой системы выявляли продукцию клетками метаболитов оксида азота NO. Исследовали указанные показатели функциональной активности фагоцитов при оценке бактерицидного потенциала после инкубации с *Y. pseudotuberculosis*. При изучении функционального состояния нейтрофилов и макрофагов животных, подвергнутых однократному воздействию высокой (+30°C) температуры, установлено, что наиболее физиологичным является временное воздействие до 4 ч. Более длительное воздействие проявляется в резком ухудшении общего состояния животных, так как для мышей оптимальный температурный диапазон содержания составляет от +14 до +18°C.

Фермент АМФаза локализуется в плазматической мембране клеток, и его активность регулирует уровень циклического АМФ, который обеспечивает передачу сигналов из внеклеточного пространства, и его содержание снижается в стимулированных клетках. Обнаружено достоверное снижение показателя активности АМФазы до $-8,3 \pm 0,6\%$ через 4 ч после воздействия высокой температуры, тогда как после воздействия низкой подобного изменения показателей не обнаружено (рис. 1А). Повышение показателей после контакта с *Y. pseudotuberculosis* указывало на реализацию бактерицидного потенциала фагоцитов.

В реакции преобразования субстратов при формировании супероксидного аниона кислорода O_2^* из молекулы кислорода принимают участие сукцинат- и лактатдегидрогиназы, которые активизируются на последнем этапе гликолиза. Значительное снижение индекса стимуляции для ЛДГ в клетках животных обнаруживались через 4 ч после воздействия высокой температуры, и достигло значения $-13,4 \pm 0,8\%$ (рис. 1Б). В фагоцитах животных, подвергнутых воздействию низкой температуры, напротив, показатели активности фермента повышались. ЦХО является терминальной оксидазой аэробной дыхательной цепи переноса электронов и ее активность коррелирует с метаболизмом клеток. Повышение активности ЦХО в фагоцитах, обнаруженное при воздействии высокой температуры на животных, указывало на стимуляцию метаболизма в этих клетках (рис. 1В). Также определенное значение при исследовании ферментативной активности фагоцитов имеет оценка состояния МПО, которая принимает участие в защитной реакции клетки от избыточного

количества реактивных посредников кислорода. Установлено достоверное снижение индекса стимуляции до $-4,1 \pm 0,5\%$ через 4 ч воздействия высокой температуры (рис. 1В). Образование оксида азота, наряду с продукцией активных метаболитов кислорода, обнаруживается в стимулированных бактериями и провоспалительными цитокинами фагоцитах. С помощью Гриесс-реакции определения метаболитов оксида азота — нитритов — нами была установлена несостоятельность нитриксиобразующей активности клеток под влиянием высокой температуры. Это выразилось в снижении внутриклеточного содержания нитритов по сравнению с показателями для интактных животных. Минимальный показатель наблюдался после 4 ч воздействия на животных и составил $-7,34 \pm 0,6\%$.

Таким образом, установлено, что в условиях гипертермии, изменение функционального состояния клеток по показателям активности ферментов АМФазы, ЛДГ, ЦХО и МПО было существеннее, чем при воздействии на животных низкой температуры ($+4^\circ\text{C}$). Во временном отношении наиболее выраженная функциональная

недостаточность по данным показателям фагоцитов выявлялась после 4 ч воздействия высокой температуры.

По показателям фагоцитоза установлено, что воздействие высокой температуры на экспериментальных животных ($+30^\circ\text{C}$) изменяет функциональное состояние клеток врожденного иммунитета (табл. 1). Представленные в таблице данные демонстрируют, что наибольшее значение индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ), которое отражает выживание и размножение бактерий в клетках, определялось в клетках животных, подвергнутых воздействию высокой температуры ($+30^\circ\text{C}$) в течение 4 ч. Данный показатель вычисляется как соотношение разницы между показателями фагоцитарного индекса (ФИ, количество поглощенных клетками бактерий) через 120 и 30 мин к показателю ФИ через 30 мин.

С целью уточнения состояния защитных функций клеток исследовались показатели активности ферментов клеток после воздействия температуры в динамике до 21 сут наблюдения. Обнаружено, что в фагоцитах в течение всего

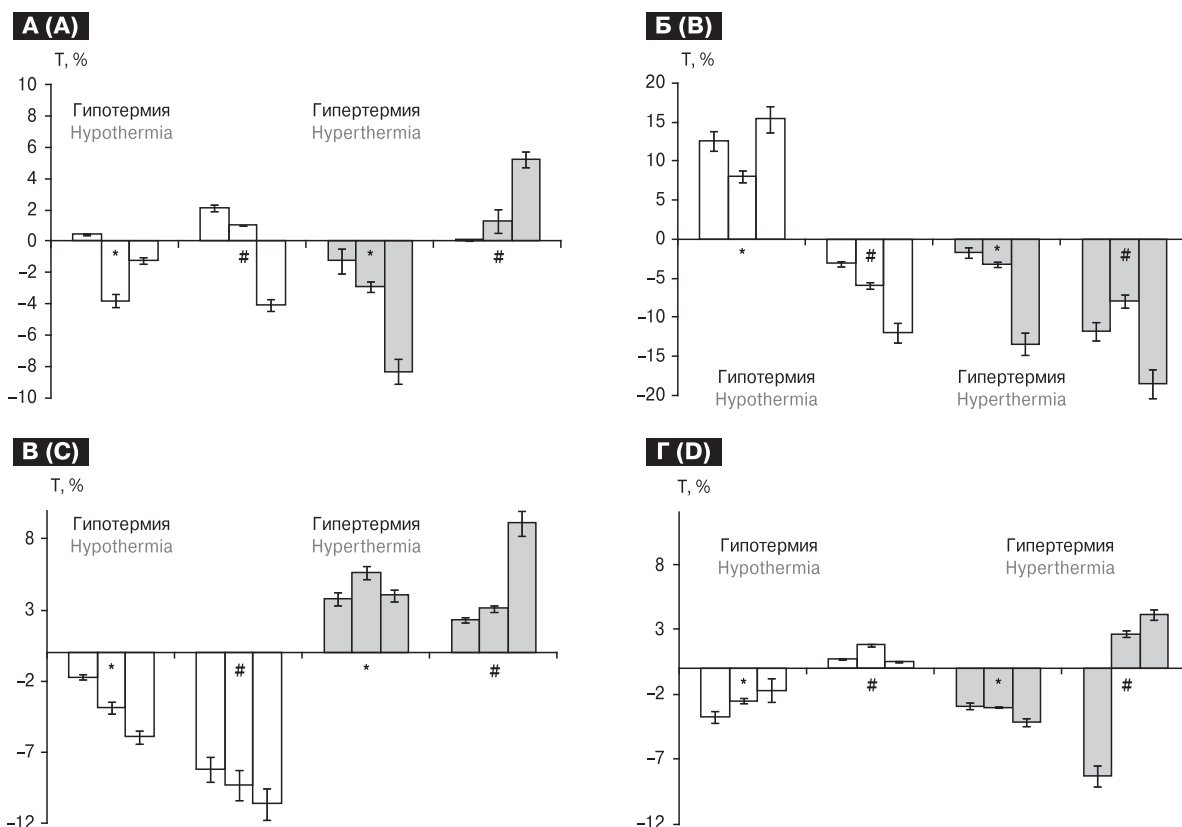


Рисунок 1. Активность ферментов АМФазы (А), лактатдегидрогеназы (Б), цитохромоксидазы (В) и миелопероксидазы (Г) нейтрофилов и макрофагов животных, после 2, 3 и 4 ч воздействия (1, 2, 3 столбики соответственно) низкой (гипотермия) и высокой (гипертермия) температуры

Figure 1. The activity of enzymes AMFase (A), lactate dehydrogenase (B), cytochrome oxidase (C) and myeloperoxidase (D) neutrophils and macrophages of animals, after 2, 3 and 4 hours of exposure (1st, 2nd, 3rd columns respectively) to low (hypothermia) and high (hyperthermia) temperatures

Примечание. * — нестимулированные фагоциты; # — после 30 мин контакта с *Y. pseudotuberculosis*.

Note.* — unstimulated phagocytes; # — after 30 min contact with *Y. pseudotuberculosis*.

Таблица 1. Фагоцитарные показатели клеток врожденного иммунитета

Table 1. Phagocytic indices of innate immunity cells

Показатели фагоцитоза Phagocytic indices		Группа 1 Group 1	Группа 3 (+30°C) Group 3 (+30°C)			Группа 4 (3 сут) Group 4 (3 days)	Группа 5 (3 сут) Group 5 (3 days)
			2 ч 2 hours	3 ч 3 hours	4 ч 4 hours		
Фагоцитарный индекс, ФИ Phagocytic index, PI	30 мин 30 min	7,8±0,5	7,1±0,8	6,5±0,4*	4,6±0,5**	6,1±0,5*	5,7±0,4**
	120 мин 120 min	9,2±0,8	8,9±0,7	10,2±1,5	12,4±1,3*	8,7±0,7	8,9±0,6
Фагоцитарный показатель, ФП (%) Phagocytic index, PI (%)	30 мин 30 min	87±7,5	87±7,2	75±6,5	58±5,1*	74±6,5	68±6,8
	120 мин 120 min	92±6,7	92±7,4	92±7,1	92±8,4	89±7,2	87±7,2
Индекс завершенности фагоцитоза, ИЗФ Index of phagocytosis completeness, IPF		0,2	0,3	0,6	1,7**	0,4	0,6

Примечание. *Сравнение со значениями для контроля при коэффициенте вероятности $p < 0,005$; **сравнение со значениями для контроля при коэффициенте вероятности $p < 0,001$.

Note. *Comparison with the values for the control with a probability coefficient $p < 0.005$; **comparison with the values for the control with a probability factor $p < 0.001$.

наблюдаемого периода отмечались сниженные показатели индекса стимуляции АМФазы, что указывало на стимулированное состояние клеток (рис. 2). По сравнению с контролем, наиболее выраженное снижение активности фермента наблюдалось через 3 сут после окончания воздействия высокой температуры на животных, индекс стимуляции составил $-15,03 \pm 1,7\%$. Также в этих клетках отмечалось снижение активности ЦХО и МПО, причем показатели для ЦХО не достигали контрольных на протяжении всего периода наблюдения при минимальном значении

через 3 сут. Индекс стимуляции в этот период составил $-13,2 \pm 1,2\%$, что указывало на нарушение защитной реакции клеток в ответ на температурный стресс (рис. 2). Причем в фагоцитах на протяжении всего наблюдаемого периода отмечалось повышенное содержание нитритов и ЛДГ.

Интерес представляют данные, полученные по изучению активности клеток животных после однократного воздействия высокой температуры и инфицированных вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis*. У всех животных, под-

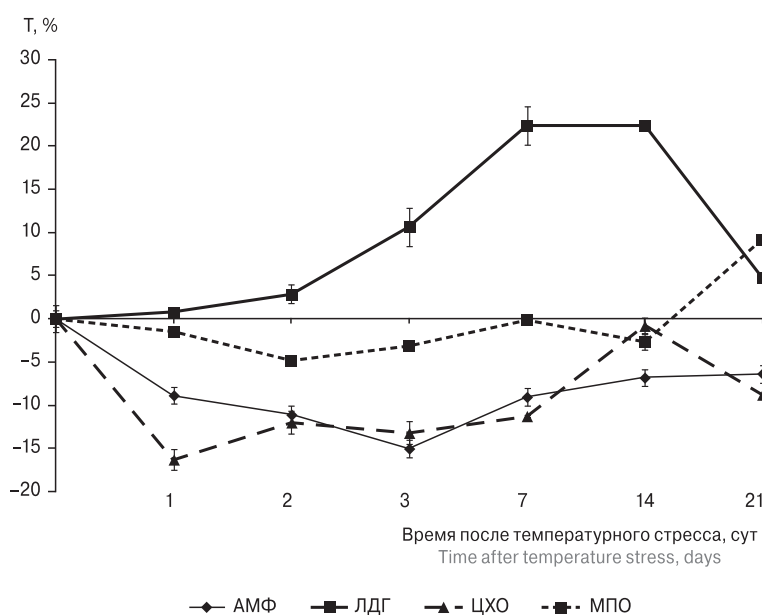


Рисунок 2. Активность ферментов АМФазы, лактатдегидрогеназы, цитохромоксидазы и миелопероксидазы в нейтрофилах животных, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры

Figure 2. The activity of enzymes AMFase, lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase and myeloperoxidase in neutrophils and macrophages of animals, after prolonged exposure to high temperature

вергнутых общей гипертермии, в течение первых суток отмечалась одышка, взмокающая шерсть. После заражения *Y. pseudotuberculosis*, начиная с 3-х сут у мышей 4-й и 5-й групп появлялись клинические признаки заболевания: вялость, отказ от пищи, часть животных последней группы погибла (23,6%). Проявления псевдотуберкулезной инфекции у животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, были более тяжелыми с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными контрольной группы без теплового стресса. Так, если полумлетальная доза LD_{50} для интактных животных составила $1,1 \times 10^8$ бактерий, то для групп животных подвергнутых однократному воздействию высокой температуры составило $5,41 \times 10^7$ и трехкратному $8,57 \times 10^7$. Эти данные указывают, что количество бактерий, вызывающих гибель 50% животных, уменьшалось в отношении мышей, подвергнутых тепловому стрессу.

В целом после предварительного теплового стресса у инфицированных животных в начальные сроки (до 7 сут) наблюдалась высокая стимуляция эффекторных клеток воспаления, усиливался их метаболизм, который выражался в повышении активности ферментов кислород-зависимой системы, а также в высокой нитроксидпродуцирующей активности (рис. 3). Активность ЛДГ и МПО в клетках животных зараженных после теплового стресса достигала максимального значения в первые трое суток после заражения и составила $14,9 \pm 1,4$ и $7,5 \pm 0,8\%$ соответственно, тогда как в фагоцитах животных, только зараженных бактериями, значения для этих ферментов составили $2,8 \pm 0,3$ и $-5,2 \pm 0,4\%$. В клетках этих животных не проявлялась активность ЦХО, тогда как количество метаболитов NO, выделяемых клетками, было высоким. Так, индекс стимуляции нарастал к 3 сут после заражения, достигая максимального значения

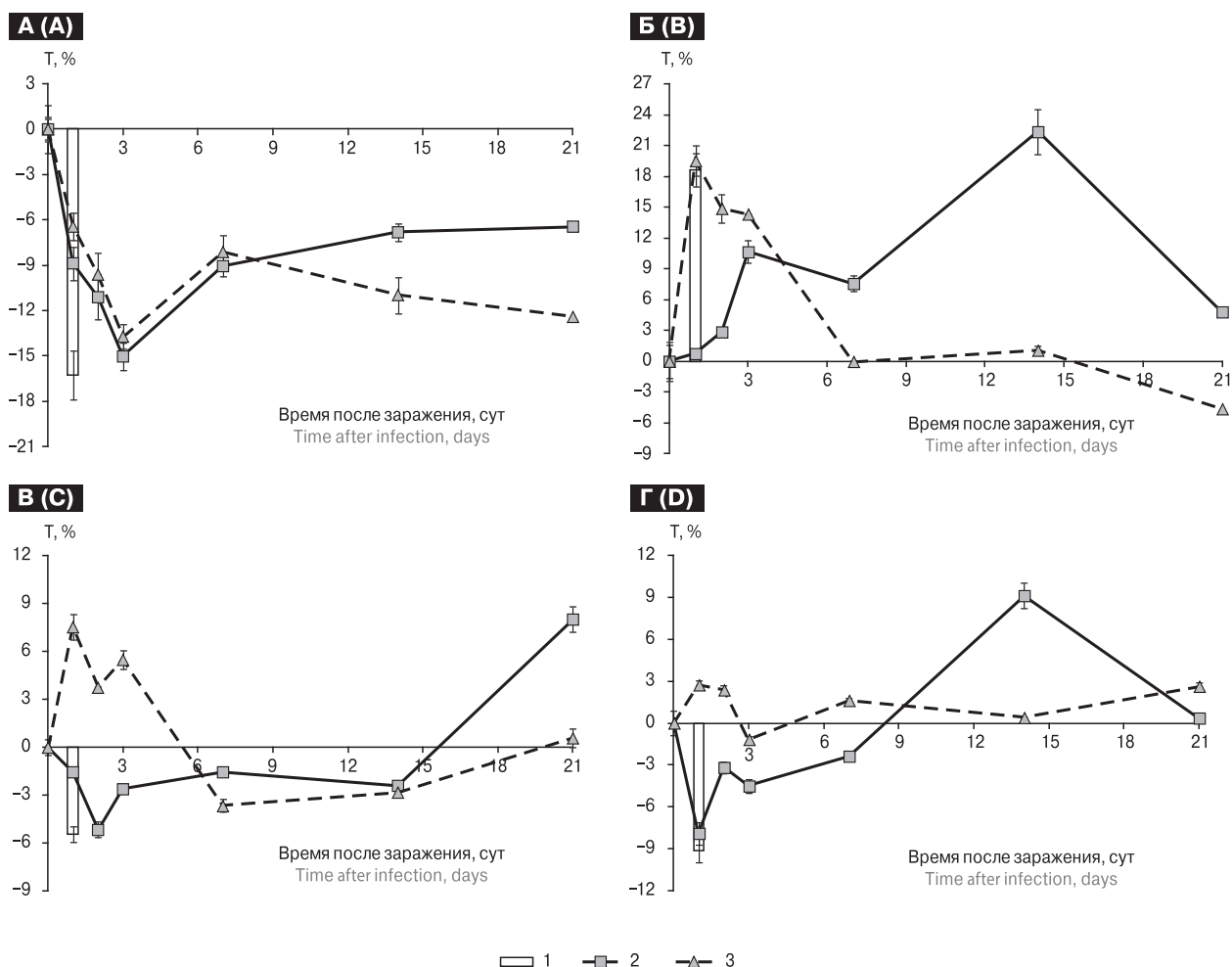


Рисунок 3. Активность ферментов АМФазы (А), лактатдегидрогеназы (Б), миелопероксидазы (В) и цитохромоксидазы (Г) в нейтрофилах и макрофагах интактных животных (1), зараженных *Y. pseudotuberculosis* (2) и предварительно, до инфицирования, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры (3)

Figure 3. The activity of AMPase (A), lactate dehydrogenase (B), myeloperoxidase (C) enzymes and cytochrome oxidase (D) in neutrophils and macrophages of intact animals (1), infected with *Y. pseudotuberculosis* (2), and before infection, subjected to a single exposure to high temperature (3)

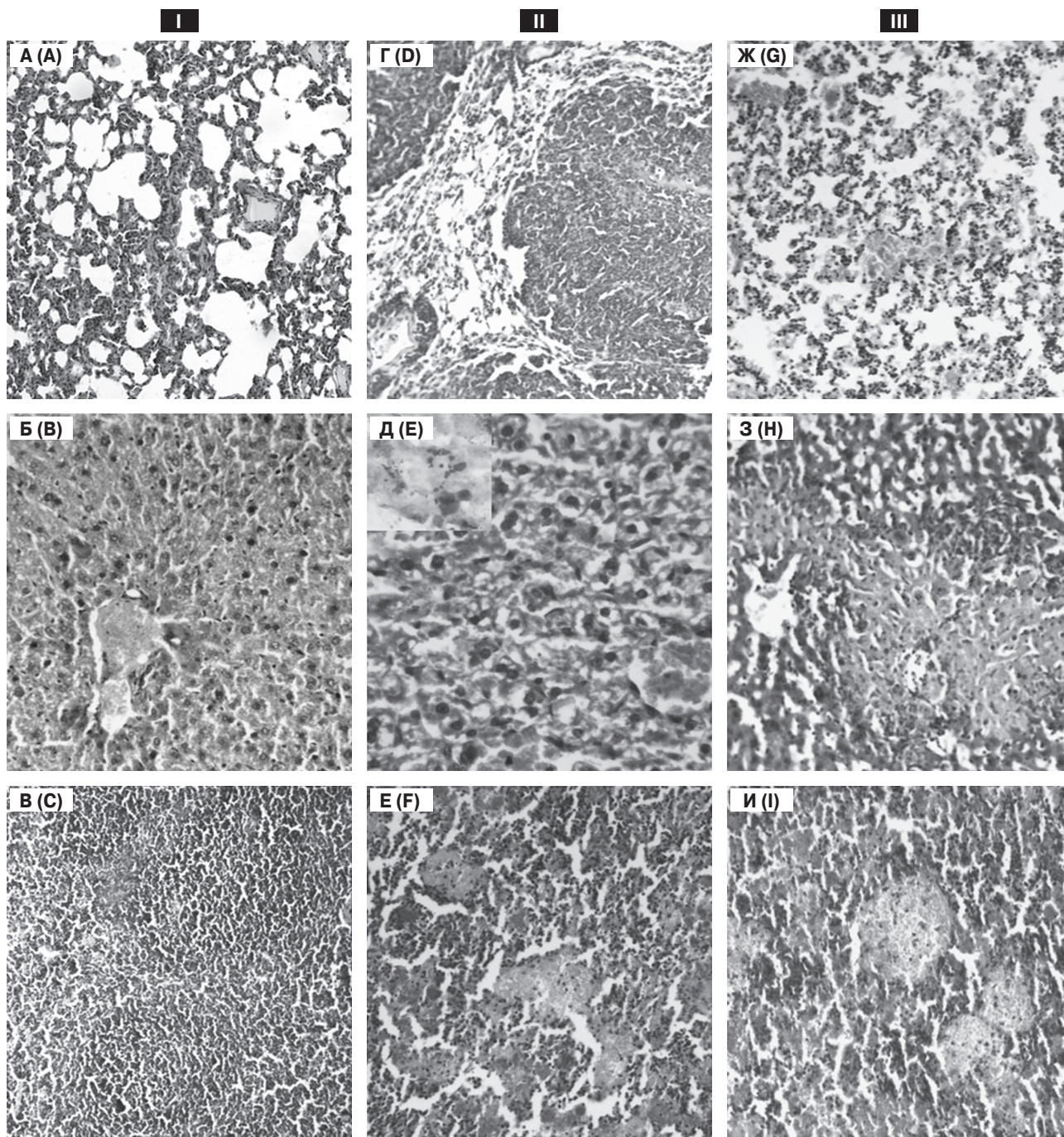


Рисунок 4. Органы животных после гипертермии

Figure 4. Organs of animals after hyperthermia

(I): А) умеренно выраженная сосудистая реакция в легком, $\times 100$; Б) многочисленные пикноморфные гепатоциты, $\times 200$; В) фолликулярная гиперплазия селезенки $\times 100$. Органы мышей, зараженных *Y. pseudotuberculosis* (II): Г) картина гранулематозного воспаления в легком; Д) выраженная зернистая дистрофия печени с апоптозными клетками, глыбки хроматина (фрагмент); Е) делимфатизация селезенки $\times 200$. Органы животных, зараженных *Y. pseudotuberculosis* после предварительной гипертермии (III): Ж) диффузное воспаление с выраженным геморрагическим компонентом в легком; З) воспалительный очажок в печени с распадом гепатоцитов; И) оголение ретикулярной стромы селезенки, $\times 200$. Окраска гематоксилином и эозином.

(I): A) a mild vascular reaction in the lung, $\times 100$; B) numerous pycnomorphogenic hepatocytes, $\times 200$; C) follicular hyperplasia of the spleen $\times 100$. The organs of mice infected with *Y. pseudotuberculosis* (II): D) granulomatous inflammation in the lung; E) severe granular dystrophy of the liver with apoptotic cells, fragments of chromatin (fragment); F) delimitation of the spleen $\times 200$. The organs of animals infected with *Y. pseudotuberculosis* after preliminary hyperthermia (III): G) diffuse inflammation with a pronounced hemorrhagic component in the lung; H) inflammatory foci in the liver with the disintegration of hepatocytes; I) denudation of the reticular stroma spleen, $\times 200$. Staining of hematoxylin and eosin.

(49,5±3,6%), после чего снижался к концу срока наблюдения (19,7±1,7%). В указанные сроки показатель для фагоцитов животных без предварительного воздействия высокой температурой и зараженных *Y. pseudotuberculosis* составил 15,1±1,4 и 8,7±0,9% соответственно.

В легких животных, исследованных в катаболическую фазу после воздействия гипертермии (первые часы после нее), отмечалась умеренно выраженная сосудистая реакция, в просвете части альвеол содержались эритроциты (рис. 4А). В печени отмечалось умеренное полнокровие сосудов, отчетливые дистрофические изменения, пикноз гепатоцитов обнаруживался преимущественно в периферическом отделе печеночных долек и в области портальных трактов (рис. 4Б). В селезенке выявлялась незначительная фолликулярная гиперплазия со слиянием фолликул белой пульпы (рис. 4В).

У животных, инфицированных *Y. pseudotuberculosis*, без предварительной гипертермии, в легких наблюдались гранулемы преимущественно из мононуклеарных клеток, которые с увеличением времени после заражения преобразовывались в обширные очаги воспаления и, у отдельных животных, отмечался значительный распад клеток очагов гранулематозного воспаления (рис. 4Г). Через 21 сут после заражения, у внешне активных животных, сохранялись типичные гранулемы, отграниченные соединительнотканной капсулой, характерные для псевдотуберкулезной инфекции, вызываемой вирулентным штаммом с плазмидами 45:82 MDa. В печени через 7 сут после заражения животных наблюдались многочисленные гранулемы небольших размеров без четкого отграничения от окружающей паренхимы, а также крупные участки эозинофильной дистрофии гепатоцитов с диффузной пролиферацией клеток Купфера (рис. 4Д). В селезенке наличие инфекции отмечалось появлением признаков делимфатизации пульпы селезенки с гигантоклеточной реакцией в красной пульпе (рис. 4Е).

В легких животных, предварительно, до заражения *Y. pseudotuberculosis* подвергнутых воздействию высокой температуры, наблюдались дилатация и резкое полнокровие сосудов типа венул, участки дистелектаза с повреждением стенки многих альвеол и бронхиол. Стенка многих венул была разрушена, в их просвете содержалась эозинофильная масса из лизированных клеток. Определялись крупные очаги воспаления, типичные для псевдотуберкулезной инфекции, с обилием мелкозернистого детрита в центре без четкого отграничения от окружающей ткани (рис. 4Ж). У отдельных животных наблюдались очажки гранулематозного воспаления, в которых визуализировались апоптотные клетки. В печени животных на фоне изменений, вызванных тепловым стрессом, обнаружены гранулематозное воспаление при наличии много-

численных рыхлых очажков, состоящих из мононуклеарных клеток с примесью клеточного детрита, незначительная пролиферация клеток Купфера (рис. 4З). В селезенке определялись деструктивные изменения клеток и отчетливая делимфатизация части фолликулов белой пульпы, встречались единичные крупные гранулемы с центральным некрозом и разреженной окружающей зоной (рис. 4И).

В целом, данные гистологического исследования органов-мишеней животных, предварительно до заражения *Y. pseudotuberculosis*, подвергнутых однократному воздействию высокой температуры, указывают на более резкое нарушение гемоциркуляции в сочетании со значительными деструктивными изменениями по сравнению с результатами исследования органов животных с инфекцией. Причем у погибших животных на фоне выраженного геморрагического компонента патологического процесса и слабой клеточной воспалительной реакции наблюдалось истощение органов иммунной системы (делимфатизация), что указывало на снижение защитных реакций организма и развитие иммунодефицита.

Обсуждение

Итак, нами установлено, что в условиях теплового стресса (+30°C), напряженность реакции клеток врожденного иммунитета по показателям функциональной активности (АМФазы, ЛДГ, ЦХО, МПО) была выше, чем при воздействии на животных низкой температуры (+4°C). В указанных температурных условиях высокий уровень праймированности клеток снижал киллинговый потенциал, о чем свидетельствовали фагоцитарные показатели. Таким образом, после проведения общей гипертермии у животных отмечается снижение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, что может быть объяснено с позиций развития «стресс-синдрома» в ответ на воздействие высокой температуры. Изменения метаболизма клеток, по видимому, оказывает влияние на синтез молекул адгезии и других факторов, таких как цитокины, которые в дальнейшем оказывают влияние на развитие иммунного ответа [21].

Реакция теплового шока — древний и консервативный процесс, который необходим для выживания организма в изменяемом экологическом окружении, в том числе при возникновении экстремальных температур. Так, лихорадка является поздним ответом на инфекцию, при котором организм временно подвергается температурному стрессу. Биохимические последствия лихорадки и теплового шока могут быть направлены на уничтожение или ингибирование роста патогенов, чувствительных к повышению температуры, индуцировать деятельность цитопротекторных белков теплового шока (Hsps) в клет-

ках-хозяевах или запускать экспрессию в самих возбудителях этих белков Hsps, тем самым активируя защиту организма с модификацией его реактивности [4]. Повышение температуры тела на 2–3°C во время лихорадки активирует механизм отклика теплового шока при модификации экспрессии генов цитокинов и хемокинов, изменяя клеточную сигнализацию и мобилизацию иммунных клеток к участкам воспаления, инфекции и травмы [19]. В литературе активно дискутируется вопрос о механизмах действия локальной и общей гипертермии на организм человека и ее влиянии на патогенез различных заболеваний. Предполагается, что на фоне теплового стресса происходит динамическое изменение системы иммунитета, когда на определенных сроках после общей гипертермии и/или при ее длительном воздействии отмечается активация или угнетение функции иммунокомпетентных клеток [2, 13], и также, очень ограничено, встречаются публикации, отражающие влияние общей гипертермии на патоморфогенез инфекционных заболеваний.

С другой стороны, лихорадка при бактериальной инфекции не всегда может выступать в роли защиты, и ее проявление зависит от вида патогенного микроорганизма [20]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что у животных, предварительно подвергнутых тепловому стрессу, проявления экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции более тяжелые с увеличением показателей летальности в 2,6 раза, по сравнению с животными, просто зараженными *Y. pseudotuberculosis*. Таким образом, концепция термического ограничения инфекции очевидна, но не всегда выполнима, так как при воздействии высокой температу-

ры на иммунную систему организма осуществляемый контроль над развитием инфекции не всегда положителен. Например, секреция пирогенных цитокинов в ответ на инфекцию индуцирует возникновение локальных иммунных реакций и связанный с ними окислительный взрыв в нейтрофилах, что в последующем отмечается миграцией иммунных клеток в инфицированные ткани и наличием некроза окружающих тканей [5, 9]. С другой стороны, полученные нами данные на экспериментальной модели бактериальной инфекции при предварительном воздействии высокой температуры (+30°C) указывают на адекватность используемой модели с целью воспроизведения индуцированного вторичного иммунодефицита для изучения влияния клеток врожденного иммунитета на развитие инфекции. Во временном отношении наиболее выраженная функциональная недостаточность указанных клеток выявлялась после 4 ч воздействия, существенно снижая показатели активности фагоцитов. Причем в случае пролонгированного воздействия высокой температуры обнаруживаются последствия окислительного стресса фагоцитов, который приводит к снижению ресурса защиты клеток. В этих условиях способность макрофагов и нейтрофилов в активном состоянии продуцировать оксид азота, который оказывает влияние на синтез IFN γ и TNF α [14], позволяет данным клеткам быть эффекторами каскада иммунных реакций и в последующем воздействовать на адаптивную реакцию организма при гипертермии. В целом, недостаточная реактивность клеток врожденного иммунитета оказывает влияние на патогенез бактериальной инфекции, утяжеляя ее течение.

Список литературы/References

1. Баллюзек Ф.В., Баллюзек М.Ф., Виленский В.И., Горелов С.И., Жигалов С.А., Иванов А.А., Кузьмин С.Н., Определяков Г.А. Управляемая гипертермия. СПб.: Невский диалект, 2001. 110 с. [Ballyuzek F.V., Ballyuzek M.F., Vilenskii V.I., Gorelov S.I., Zhigalov S.A., Ivanov A.A., Kuz'min S.N., Opredelyakov G.A. Upravlyayemaya gipertermiya [Controlled hyperthermia]. Saint Petersburg: Nevsky dialect, 2001. 110 p.]
2. Мичурина С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю., Жданов А.П. Структурные изменения в тимусе крыс после воздействия экспериментальной гипертермии // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. 2010. № 1 (25). С. 30–33. [Michurina S.V., Vasendin D.V., Ischenko I.Yu., Zhdanov A.P. Structural changes in the thymus of rats after exposure to experimental hyperthermia. *Bulleten' Volgogradskogo nauchnogo tsentra RAMN = Bulletin of the Volgograd Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2010, no. 1 (25), pp. 30–33. (In Russ.)]
3. Arons M.M., Wheeler A.P., Bernard G.R., Christman B.W., Russell J.A., Schein R., Summer W.R., Steinberg K.P., Fulkerson W., Wright P., Dupont W.D., Swindell B.B. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit. Care Med.*, 1999, vol. 27, iss. 4, pp. 699–707. doi: 10.1097/00003246-199904000-00020
4. Casadevall A. Thermal restriction as an antimicrobial function of fever. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 5:e1005577. doi: 10.1371/journal.ppat.1005577
5. Evans S.S., Repasky E.A., Fisher D.T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, vol. 15, no. 6, pp. 335–349. doi: 10.1038/nri3843
6. Frey B., Weiss E.M., Rubner Y., Wunderlich R., Ott O.J., Sauer R., Fietkau R., Gaipf U.S. Old and new facts about hyperthermia-induced modulations of the immune system. *Int. J. Hyperthermia*, 2012, vol. 28, iss. 6, pp. 528–542. doi: 10.3109/02656736.2012.677933
7. Fisher D.T., Chen Q., Skitzki J.J., Muhitch J.B., Zhou L., Appenheimer M.M., Vardam T.D., Weis E.L., Passanese J., Wang W.C., Gollnick S.O., Dewhirst M.W., Rose-John S., Repasky E.A., Baumann H., Evans S.S. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, no. 10, pp. 3846–3859. doi: 10.1172/JCI44952

8. Grunwald M.S., Pires A.S., Zanotto-Filho A., Gasparotto J., Gelain D.P., Demartini D.R., Schöler C.M., de Bittencourt P.I.Jr., Moreira J.C. The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity. *Cell Stress Chaperones*, 2014, vol. 19, iss. 6, pp. 913–925. doi: 10.1007/s12192-014-0516-5
9. Hasday J.D., Thompson C., Singh I.S. Fever, immunity, and molecular adaptations. *Compr. Physiol.*, 2014, vol. 4, pp. 109–148. doi: 10.1002/cphy.c130019
10. Hevia A., Delgado S., Sánchez B., Margolles A. Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6:1285. doi: 10.3389/fmicb.2015.01285
11. Hume D.A. The many alternative faces of macrophage activation. *Front. Immunol.*, 2015, vol. 6:370. doi: 10.3389/fimmu.2015.00370
12. Jaillon S., Galdiero M.R., Del Prete D., Cassatella M.A., Garlanda C., Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin. Immunopathol.*, 2013, vol. 35, iss. 4, pp. 377–394.
13. Jin Y., Hu Y., Han D., Wang M. J. Chronic heat stress weakened the innate immunity and increased the virulence of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 in mice. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, 10 p. doi: 10.1155/2011/367846
14. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, vol. 27, pp. 451–483. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532
15. Mikucki M.E., Fisher D.T., Ku A.W., Appenheimer M.M., Muhitch J.B., Evans S.S. Preconditioning thermal therapy: flipping the switch on IL-6 for anti-tumour immunity. *Int. J. Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 464–473. doi: 10.3109/02656736.2013.807440
16. Radek K.A. Antimicrobial anxiety: the impact of stress on antimicrobial immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 2, pp. 263–277. doi: 10.1189/jlb.1109740
17. Repasky E.A., Eng J., Hylander B.L., Radek K.A. Stress, metabolism and cancer: integrated pathways contributing to immune suppression. *Cancer J.*, 2015, vol. 21, no. 2, pp. 97–103. doi: 10.1097/ppo.000000000000107
18. Schmidt S., Moser M., Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol. Immunol.*, 2013, vol. 55, no. 1, pp. 49–58. doi: 10.1016/j.molimm.2012.11.006
19. Singh I.S., Hasday J.D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int. J. Hyperthermia*, 2013, vol. 29, no. 5, pp. 423–435. doi: 10.3109/02656736.2013.808766
20. Small P.M., Tauber M.G., Hackbarth C.J., Sande M.A. Influence of body temperature on bacterial growth rates in experimental pneumococcal meningitis in rabbits. *Infect. Immun.*, 1986, vol. 52, no. 2, pp. 484–487.
21. Takeuchi O., Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, vol. 140, no. 6, pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
22. Vujaskovic Z., Poulson J.M., Gaskin A.A., Thrall D.E., Page R.L., Charles H.C., MacFall J.R., Brizel D.M., Meyer R.E., Prescott D.M., Samulski T.V., Dewhirst M.W. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2000, vol. 46, iss. 1, pp. 179–185. doi: 10.1016/S0360-3016(99)00362-4

Авторы:

Плехова Н.Г., д.б.н., зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет (ТГМУ) МЗ РФ, г. Владивосток, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Сомова Л.М., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Дробот Е.И., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Лагурева А.В., младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Ляпун И.Н., к.б.н., зав. лабораторией клеточной биологии и гистопатологии ФГБНУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, г. Владивосток, Россия;

Кондрашова Н.М., к.м.н., доцент Института терапии и инструментальной диагностики ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Огнева С.Д., аспирант Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Plekova N.G., PhD, MD (Biology), Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation; Leading Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Somova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Drobot E.I., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Lagureva A.V., Junior Researcher, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Lyapun I.N., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Cellular Biology and Histopathology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russian Federation;

Kondrashova N.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Institute of Therapy and Instrumental Diagnostics, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Ogneva S.D., PhD Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.07.2017
Отправлена на доработку 23.01.2018
Принята к печати 27.02.2017

Received 07.07.2017
Revision received 23.01.2018
Accepted 27.02.2017

МИКРОБНЫЙ СОЦИУМ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НИШИ: РОТОВАЯ ПОЛОСТЬ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

А.Л. Бурмистрова, Ю.Ю. Филиппова, Д.Ю. Нохрин, А.В. Тимофеева

ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет, г. Челябинск, Россия

Резюме. В последние годы слюна все чаще используется в качестве диагностической жидкости для оценки различных биологических параметров, а именно уровней активности информационных сигнальных молекул метаорганизма — иммунной-эндокринной природы, но реже — метаболитов микробного сообщества и структуры бактериального социума. В работе проведена оценка микробного социума ротовой полости (слюна/мазок с поверхностей проживания микробиоты) здоровых детей с целью создания микробных образцов «здоровья» — контроля, который может использоваться в изучении микробного сообщества при развитии локальных и/или системных патофизиологических процессов, в том числе инфекционной природы, в организме ребенка. С помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров определены специфические химические маркеры 38 таксонов микроорганизмов в полости рта здоровых детей от 1,5 до 14 лет. Для выявления распределения различных представителей микробных социумов между экологическими нишами (слюна/мазок) в ротовой полости и оценки влияния на них возраста детей был использован многомерный статистический метод — канонический анализ соответствий. Обнаружено высокое сходство структуры микробиоты слюны и мазка с поверхностями проживания микробиоты у здоровых детей, что, возможно, свидетельствует о перекрестных путях движения бактериальных представителей различных видов и родов микробного сообщества или об их функциональной пластичности. Наибольший интерес представляют данные о количестве бактерий рода *Alcaligenes* spp. в мазке с поверхностями проживания микробиоты, которое в два раза превышает аналогичный показатель в слюне. *Alcaligenes* продуцирует антибиотики и оригинальные антибактериальные компоненты, дезорганизующие рост широкого круга бактерий, а также инициирует В-лимфоциты лимфоидных фолликулов к продукции *Alcaligenes*-специфичных антител, для создания из них собственного «плащевое» покрытие, облегчающего ее поступление в Пейеровы бляшки через М-клетки. Можно предположить, что уровень *Alcaligenes* spp. в слюне в какой-то степени отражает миграцию представителей данного рода как из небных, так и из назофарингеальных миндалин. Определены возрастные особенности микробиоты экологической ниши — ротовой полости: с возрастом у детей повышается число представителей рода *Clostridium* spp. и снижается количество бифидобактерий. Полученные нами результаты могут использоваться в качестве контроля при системных патофизиологических процессах, в том числе инфекционной этиологии, а также в ходе терапии.

Ключевые слова: микробиота, ротовая полость, слюна, мазок, здоровые дети, *Alcaligenes* spp.

Адрес для переписки:

Филиппова Юлия Юрьевна
454001, Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129,
ФГБОУ ВО ЧелГУ.
Тел.: 8 (351) 799-71-76 (служебн.).
Факс: 8 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Contacts:

Yuliya Yu. Filippova
454001, Russian Federation, Chelyabinsk, Bratiev Kashirinykh str., 129,
Chelyabinsk State University.
Phone: +7 (351) 799-71-76 (office).
Fax: +7 (351) 742-09-25.
E-mail: julse@rambler.ru

Библиографическое описание:

Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Нохрин Д.Ю., Тимофеева А.В.
Микробный социум экологической ниши: ротовая полость
здоровых детей // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 54–60.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60

Citation:

Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Timofeeva A.V. Microbial
society of environmental niche: oral cavity of the healthy children // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1,
pp. 54–60. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-54-60

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL NICHE: ORAL CAVITY OF THE HEALTHY CHILDREN**Burmistrova A.L., Filippova Yu.Yu., Nokhrin D.Yu., Timofeeva A.V.***Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation*

Abstract. In recent years, saliva is increasingly being used as a diagnostic fluid for the evaluation of various biological parameters, namely, the levels of activity of the information signal molecules of the metaorganism — the immune-neuroendocrine nature, but less often the metabolites of the microbial community and the structure of the bacterial society. The paper assesses the microbial society of the oral cavity (saliva/smear from the surfaces of the microbiota) healthy children in order to create microbial images of «health» — control that can be used in the study of the microbial community in the development of local and/or systemic pathophysiological processes, including infections, in the child's body. Using the method of Gas chromatography mass spectrometry of microbial markers, specific chemical markers of 38 taxa of microorganisms in the oral cavity of healthy children from 1.5 to 14 years have been determined. To determine the distribution of various representatives of microbial societies between ecological niches (saliva/smear) in the oral cavity and assess the effect on them of the age of children, a Canonical Correspondences Analysis was used. A high similarity of the microbiota structure of saliva and smear from microbiota living surfaces in healthy children was found, which may indicate cross paths of bacterial representatives of different species and genera of the microbial community, or their functional plasticity. Of greatest interest are the data on the number of bacteria of the genus *Alcaligenes* spp. in the smear from the surfaces of the microbiota, which is twice higher, than in saliva. *Alcaligenes* presents itself as a professional organizer of security measures in relation to the place of residence: it produces antibiotics and original antibacterial components that disorganize the growth of a wide variety of bacteria. In addition, it is able to initiate B-lymphocytes of lymphoid follicles to produce *Alcaligenes*-specific antibodies, to create from them their own «cloaking» coating, facilitating its entry into Peyer's plaques through M-cells. It can be assumed that the level of *Alcaligenes* spp. in saliva to some extent reflects the migration of representatives of this genus, both from the palatine and from the nasopharyngeal tonsils. The age features of the microbiota of the ecological niche — the oral cavity are determined: the number of representatives of the genus *Clostridium* spp. increases with age in children. And the number of bifidobacteria decreases. The results obtained by us can be used as a control in systemic pathophysiological processes, including infectious etiology, as well as during therapy.

Key words: *microbiota, oral cavity, saliva, smear, healthy children, Alcaligenes spp.*

Введение

Ротовая полость является уникальной открытой/закрытой экологической системой, в которой созданы благоприятные условия для нормальной жизнедеятельности огромного сообщества микроорганизмов, по плотности колонизации и разнообразию занимающих второе место после толстого кишечника человека. Оральный сообщество включает в соответствии с Human Oral Microbiome Database (HOMD; www.homd.org) 13 типов микроорганизмов: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeata*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *SRI*, *Synechistis*, *Tenericutes* и *TM7*, из которых шесть (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* и *Fusobacteria*) — презентуют множество (96%) флотипов на уровне видов [9, 18, 19]. Такой сложный бактериальный консорциум не живет по правилу «все и везде», а демонстрирует отличия в композиции структур микробных сообществ, даже на уровне типов. Так *Firmicutes* доминирует на слизистой поверхности щек [22]), среди различных малых внутриоральных мест проживания микробиоты (дентальных поверхностей, эпителия щек, поверхностей мягкого и твердого неба, языка, миндалин, горла и т. д.), которые детально опи-

саны в количестве 5–9 и более рядом авторов [2, 6, 9, 18, 22]. Такие данные подтверждают наличие строгого локального пресса на членов сообщества даже в условиях физиологического гомеостаза [18, 22]. Как отмечают авторы, эти различия наиболее выражены на уровне родов, флотипов и являются залогом функциональной стабильности и гомеостаза (микробное сообщество слюны выглядит стабильным примерно в течение пяти дней [13]), необходимых для здоровья экосистемы. Все малые экологические ниши внутри ротовой полости и вся ротовая полость в целом омываются слюной, которая является для резидентного сообщества бактерий основным источником питания и, кроме того, важным участником совместного с резидентами создания колонизационной резистентности, выступая гарантом сохранения устойчивости микробного социума. Более того, в настоящее время представлен ряд доказательств, свидетельствующих, что слюна способна выступать в качестве экстраординарной коммуникационной системы, интегрирующей сигналы глобальных информационных сетей между: 1) бактериальными клетками, каждая из которых представляет биологическую автономную систему с собственной внутриклеточной информационной способностью, позволяющей отвечать на биохимические сигналы,

получаемые от всего микробного сообщества [5]; 2) всеми клетками микробных социумов малых и больших ниш внутри ротовой полости и даже других отделов дигестивного тракта [10, 18]; 3) информационными сигналами биохимического «зеркала» гомеостаза макроорганизма. Но слюна, в отличие от малых экологических стационарных ниш, не является местом проживания микробиоты. Она, главным образом, функционирует как транспортная среда для расселения микробного социума ротовой полости, которая отправляет в плавание ежедневно около 10^{11} бактериальных клеток изо рта в желудок, что приводит, как продемонстрировано различными культуральными и молекулярными методами, к частичному совпадению оральных, фарингеальных, эзофагального и кишечного микробиомов [10, 18].

В последние годы слюна все чаще используется в качестве диагностической жидкости для оценки различных биологических параметров, а именно уровней активности информационных сигнальных молекул метаорганизма — иммунонейроэндокринной природы, но реже — метаболитов микробного сообщества и структуры бактериального социума [21]. Оценка микробного сообщества ротовой полости может быть проведена двумя путями: 1) изучением паттерна подвижного микробного социума слюны, презентующего суммарный образ практически всех (или большинства) аэродигестивных бактериальных представителей, «пустившихся в плавание» в данный период времени: транзитных и резидентных, отправившихся в «одиссею» как на слущенном эпителии, в ходе его кругооборота, так и на пищевых компонентах; 2) распознаванием паттерна, включающего представителей разнообразных оседлых, биопленочных бактериальных сообществ, проживающих в различных микробиотопах ротовой полости, собранных в результате активных действий исследователя при взятии мазка.

Цель исследования: оценить микробный социум ротовой полости (слюна/мазок с поверхностей проживания микробиоты), условно-здоровых детей с целью создания микробных образов «здоровья» — контроля, который может использоваться в изучении микробного сообщества при развитии локальных и/или системных патофизиологических процессов, в том числе инфекционной природы, в организме ребенка.

Материалы и методы

В исследование было включено 16 здоровых детей (мальчиков), средний возраст которых составил $8,6 \pm 0,89$ лет. Из них 6 человек дошкольного (1,5–6 лет) и 10 человек школьного возраст-

та (7–14 лет). В качестве биологического материала для исследования использовали слюну и мазок из ротовой полости. Слюну забирали стерильным шприцем из подъязычной области и около пространства нижней десны (1 мл); мазок с поверхностей микробиотопов ротовой полости забирали стерильным тампоном: щека-щека, язык, десны, зубы, мягкое и твердое небо, небные миндалины.

Газовая хромато-масс-спектрометрия микробных маркеров. Для изучения композиции микробного социума экологической ниши — ротовой полости (слюна/мазок) был использован метод газового хромато-масс-спектрометрического определения микроорганизмов по количественному содержанию специфических маркеров (карбоновые кислоты, альдегиды, стерины, стиролы) в исследуемых образцах. Приготовление образцов и подсчет результатов проводили, как описано Осиповым Г.А. [16]: 80 мкл слюны/верхнюю часть ваты с тампона для мазка высушивали при добавлении равного по объему количества метанола (Fisher Scientific, Великобритания) и подвергали кислому метанолизу в 1 М HCl (Fisher Scientific, Великобритания) в метаноле в течение 1 ч при 80°C. На этой стадии происходило освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток и жидкостей в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты двукратно экстрагировали 200 мкл гексана (Scharlab S.L., Испания), высушивали и обрабатывали в течение 15 мин при 80°C 20 мкл бис (триметилсилил)-N,O трифторацетамидом (Sigma-Aldrich, США) для получения триметилсилильных эфиров оксикислот и стиролов. Полученную смесь эфиров вводили в инжектор газового хроматографа Маэстро GX 7820 (ООО «Интерлаб», Россия). Образец был хроматографически разделен на капиллярной колонке HP-5ms Hewlett-Packard. Условия хроматографического разделения: начальная температура 130°C, выдержка при начальной температуре 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 70°/мин до 320°C, выдержка при конечной температуре 6 мин. Режим селективных ионов. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате проведенных исследований получали хроматограммы жирных кислот и других продуктов жизнедеятельности микробных сообществ ротовой полости, которые были соотнесены с соответствующим типом и количеством микроорганизмов с помощью программы, разработанной Осиповым Г.А. [16]. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометилловый эфир тридекановый кислоты (Sigma-Aldrich, США). Чувствительность метода составляет 10^4 КОЕ/мл.

Статистический анализ. Для выявления распределения различных представителей микробных социумов между экологическими нишами (слюна/мазок) в ротовой полости и оценки влияния на них возраста пациентов использовали канонический анализ соответствий (Canonical Correspondence Analysis, CCA). Этот метод относится к группе «ограниченных» многомерных проекционных (ординационных) методов, поскольку анализирует не всю присущую данным изменчивость, а только ту ее часть, которая задается линейной комбинацией независимых переменных — регрессоров. Таким образом, CCA сочетает в себе и многомерную ординацию, и множественную регрессию. Подобно множественному анализу соответствий, в качестве расстояния в нем используется статистика хи-квадрат, а потому данный метод нашел широкое применение при анализе данных по встречаемости и численности организмов в экологии сообществ [14]. Поскольку в экологической практике использования метода регрессоры часто представляют собой средовые факторы, в градиенте которых происходит изменение видового состава, CCA относят также к методам прямого градиентного анализа [1]. Оценку статистической значимости выделенных канонических осей проводили в рандомизационном тесте Монте-Карло ($n = 9999$). Значимость различий между показателями микроорганизмов разных ниш (слюна/мазок) ротовой полости и двух возрастных групп определяли с помощью парного критерия Уилкоксона W и критерия Манна–Уитни U . Статистически значимыми признавали результаты при $p \leq 0,05$, незначимыми — при $p > 0,10$. Расчеты и графические построения выполнены в пакете PAST v. 3.15 [12].

Результаты

Для выявления наиболее общих закономерностей распределения основных бактериальных таксонов, находящихся в биоматериале, собранном из ротовой полости с использованием различных методических подходов — слюна/мазок, с доступных для исследователя поверхностей ротовой полости, использовали многомерный подход — канонический анализ соответствий. В качестве независимых переменных выступали показатели наличия и количества таксонов, распределенных по градиенту регрессоров, атрибутированных по типу биоматериала — слюна/мазок, и по возрасту детей.

В ходе анализа были выделены три канонических оси, две из которых объясняли всю задаваемую регрессорами изменчивость показателей, традиционно называемую в CCA инерцией (рис.).

Первая ось объясняла 88,4% инерции и была высоко статистически значима ($p < 0,001$). Как видно из рисунка, данная ось определяла различия в композиции бактериального сообщества, выделенного из разного биоматериала. В мазке с поверхностей микробиотопов ротовой полости у здоровых детей были повышены по сравнению с паттерном слюны уровни бактерий микроорганизмов типа *Firmicutes*: родов *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., которые являются основными резидентами ротовой полости, доминирующими главным образом, на языке и зубной поверхности [2], и вида *Clostridium perfringens*. Кроме того, в мазке с различных поверхностей ротовой полости преобладали представители типа *Bacteroidetes* рода *Prevotella* spp. и родов-космополитов: *Alcaligenes* spp. и *Aspergillus* spp.

В слюне в больших количествах присутствовали маркеры микроорганизмов: *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* spp. и грибов рода *Candida* spp. Все различия были статистически значимыми: парный критерий Уилкоксона W от 75,5 до 136, P от 0,034 до $3,1 \times 10^{-5}$. Несмотря на наличие значимых различий в уровнях специфических показателей микроорганизмов, обращает на себя внимание тот факт, что в слюне присутствовали те же роды/виды микроорганизмов, что и в мазке из всей ротовой полости, при этом большая часть определенных нами микроорганизмов была в равной степени характерна как для мазка, так и для слюны.

Вторая каноническая ось объясняла 11,6% инерции. Вдоль нее проявилась тенденция ($p = 0,066$) к возрастным изменениям видового сообщества ротовой полости. У детей дошкольного возраста в ротовой полости (не зависимо от типа биоматериала) в больших количествах присутствовали маркеры микроорганизмов *Bifidobacterium* spp. и видов *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium acnes*.

У детей школьного возраста в ротовой полости наблюдалось увеличение числа бактерий родов *Clostridium* (*C. propionicum*, *C. ramosum*, *C. histolyticum*) и *Actinomyces*. Статистически значимые различия были выявлены только для количества микроорганизмов рода *Bifidobacterium* spp., уровни липидных маркеров которых были повышены в мазках детей дошкольного возраста (1,5–6 лет).

Обсуждение

Таким образом, в результате проведенных исследований сравнения двух паттернов микробных социумов, полученных из образцов слюны и мазка с поверхности микробиотопов ротовой полости условно-здоровых детей, получены следующие данные:

Каждый паттерн презентует специфическое бактериальное сообщество по следующим таксонам: *Bacillus cereus*, *Corynebacterium* spp., *Candida* spp. — преобладали в слюне, а *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium perfringens*, *Prevotella* spp., *Aspergillus* spp. и *Alcaligenes* — в мазке. Однако 29 таксонов были общими для этих образцов, что, возможно, свидетельствует о перекрестных путях движения бактериальных представителей различных видов и родов микробного сообщества, или об их функциональной пластичности.

Наибольший интерес представляют данные о количестве бактерий рода *Alcaligenes* spp.

в паттерне, включающем представителей разнообразных оседлых биопленочных бактериальных сообществ, проживающих в различных микробиотопах ротовой полости, которое в 2 раза превышает аналогичный показатель паттерна слюны. Известно, что *Alcaligenes* spp. выступает универсальным утилизатором в различных экологических нишах в природных условиях — почвы, свежей воды, сточных вод, морских экосистем, и, кроме того, выделяется из клинического материала, полученного от больных, и из фекалий здоровых людей [8, 11]. В то же время *Alcaligenes* spp. проявляет уни-

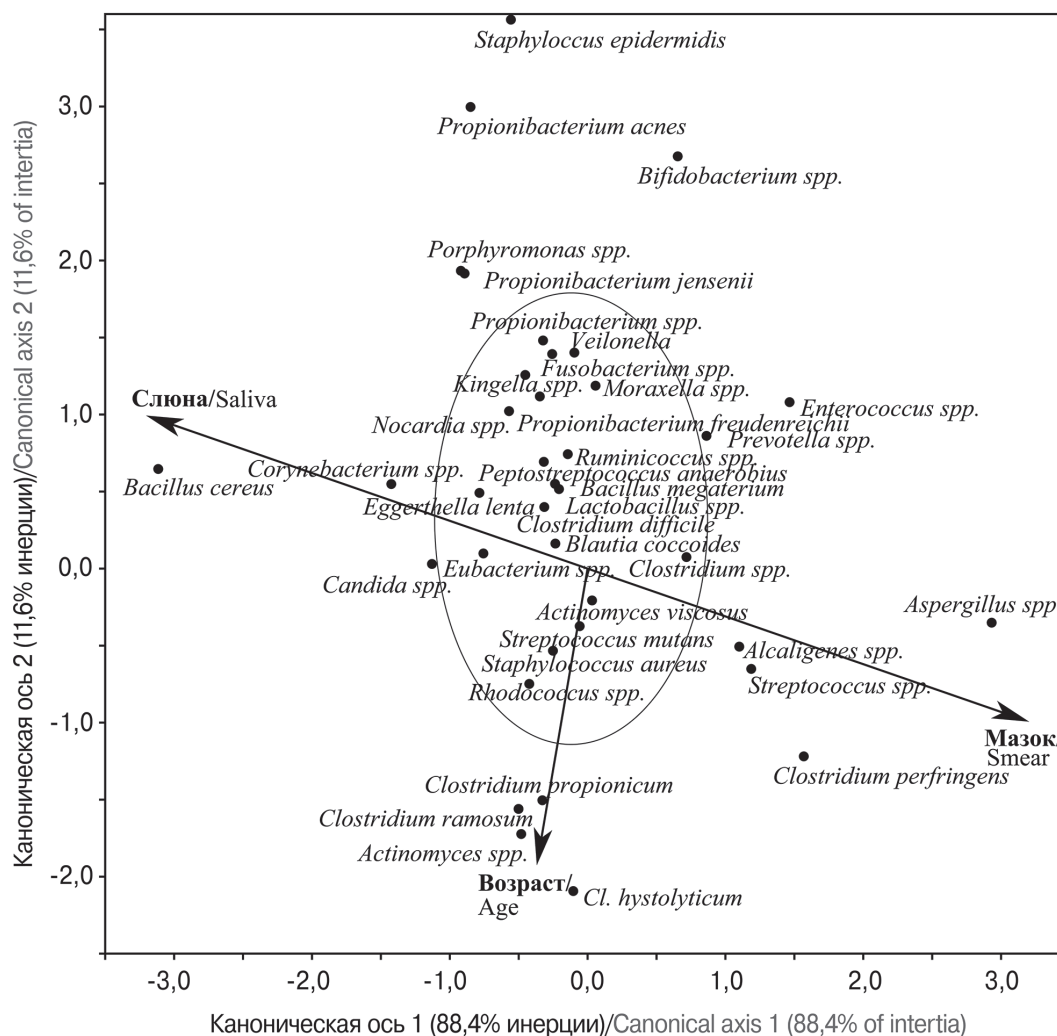


Рисунок. Ординационная диаграмма распределения представителей различных бактериальных таксонов между слюной и мазком из ротовой полости

Figure. Ordination diagram of the distribution of representatives of different bacterial taxa between saliva and smear of the oral cavity

Примечания. Стрелками показаны регрессоры (тип биоматериала: слюна/мазок и возраст). Бактериальные таксоны, расположенные в центре диаграммы и выделенные эллипсом, имеют одинаковые количественные показатели, независимо от типа биоматериала и возраста детей. Микроорганизмы, расположенные по краям рисунка (выходящие за область эллипса) вносят наибольший вклад в различия между регрессорами.

Notes. Arrows indicate regressors (type of biomaterial: saliva/smear and age). Bacterial taxa located in the center of the diagram and separated by an ellipse have the same quantitative indices, regardless of the type of biomaterial and the age of the children. Microorganisms located at the edges of the pattern (beyond the ellipse region) contribute the most to differences between regressors.

кальные функции, позволяющие ей вступать во взаимодействие с лимфоидным аппаратом здоровых мышей, обезьян и человека и апроприровать регуляцию иммунного гомеостаза организма. Речь идет о лимфоидных компартаментах кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани (GALT) [15].

Alcaligenes spp. демонстрирует В-лимфоцит-ассоциированное сожительство и сотрудничество: 1) в отсутствии В-лимфоцитов и мукозальных антител в Пейеровых бляшках снижается количество *Alcaligenes* spp. [15, 20]; 2) она способна инициировать В-лимфоциты лимфоидных фолликулов к продукции *Alcaligenes*-специфичных антител, для создания из них собственного «плащевое» покрытия, облегчающего ее поступление в Пейеровы бляшки через М-клетки, и инструктировать переключение класса антител от IgM к IgA [15, 20].

Alcaligenes презентует себя в качестве профессионального организатора охранных мероприятий в отношении места проживания: продуцирует антибиотики, ингибирующие рост других бактерий, в том числе обладающих широким спектром антибиотикорезистентности, и оригинальные антибактериальные компоненты, дезорганизирующие рост широкого круга микроорганизмов, таких как *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* [4, 20]. В свете сказанного не вызывает сомнения, что все перечисленные свойства позволяют ей успешно проживать в мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани (MALT) [3]. Можно предположить, что превышение в 2 раза уровня *Alcaligenes* в паттерне,

включающем представителей разнообразных оседлых биопленочных бактериальных сообществ различных микробиотопов ротовой полости, по сравнению с паттерном, отражающим микробный социум слюны, определено особенностью получения исследуемого материала — активным воздействием на колонизированные поверхности, среди которых присутствовали и небные миндалины, относящиеся к вторичным лимфоидным органам, содержащим агрегаты лимфоидных клеток, испытывающих пролонгированную нагрузку антигенов аэродигестивного тракта и, подобно Пейеровым бляшкам и аппендиксу, принадлежащих к MALT [7, 17]. Не исключено, что представительство *Alcaligenes* в слюне в какой-то степени отражает их миграцию как из небных, так и из назофарингеальных миндалин.

Наличие возраст-ассоциированных особенностей распределения некоторых таксонов внутри оральной полости: у детей дошкольного возраста в мазке из ротовой полости значимо повышены маркеры бактерий рода *Bifidobacterium* spp. по отношению к аналогичному показателю группы школьников. Такие изменения в уровнях бифидобактерий могут быть связаны с особенностями питания детей.

Полученные нами результаты в ходе предварительной оценки бактериального социума ротовой полости условно здоровых детей, могут использоваться в качестве контроля при системных патофизиологических процессах, в том числе инфекционной этиологии, а также в ходе терапии.

Список литературы/References

1. Джонгман Р.Г.Г., Тер Брак С.Дж.Ф., Ван Тонгерен О.Ф.Р. Анализ данных в экологии сообществ и ландшафтов: пер. с англ. М.: РАСХН, 1999. 306 с. [Jongman R.G.G., Ter Brak S.J.F., Van Tongeren O.F.R. Analiz dannykh v ekologii soobshchestv i landshaftov [Analysis of data in the ecology of communities and landscapes]. Moscow: RAASHN, 1999. 306 p.]
2. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 11, pp. 5721–5732. doi: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
3. Adam P., Gernert C., Schmitt S., Haralambieva E., Ott G., Müller-Hermelink H.K., Hentschel U. The spectrum of microbiological agents causing pulmonary MALT-type lymphomas. A 16S rRNA-based analysis of microbial diversity. *Der Pathologe*, 2008, vol. 29, suppl. 2, pp. 290–296. doi: 10.1007/s00292-008-1068-1
4. Armstrong J.L., Shigeno D.S., Calomiris J.J., Seidler R.J. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ Microbiol.*, 1981, vol. 42, no. 2, pp. 277–283.
5. Ben-Jacob E. Social behavior of bacteria: from physics to complex organization. *Eur. Phys. J. B*, 2008, vol. 65, iss. 3, pp. 315–322. doi: 10.1140/epjb/e2008-00222-x
6. Bik E.M., Davis Long C., Armitage G.C., Loomer P., Emerson J., Mongodin E.F., Nelson K.E., Gill S.R., Fraser-Liggett C.M., Relman D.A. Bacterial diversity in the oral cavity of ten healthy individuals. *ISME J.*, 2010, vol. 4, no. 8, pp. 962–974. doi: 10.1038/ismej.2010.30
7. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2003, vol. 67, suppl. 1, pp. S69–S76. doi: 10.1016/j.ijporl.2003.08.018
8. Busse H.J., Stolz A. *Achromobacter, alcaligenes and related genera. The Prokaryotes*. Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. New York: Springer, 2006, pp. 675–700. doi: 10.1007/0-387-30745-1_28
9. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 19, pp. 5002–5017. doi: 10.1128/JB.00542-10
10. Ding T., Schloss P.D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, 2014, vol. 509, pp. 357–360. doi: 10.1038/nature13178
11. Fung T.C., Artis D., Sonnenberg G.F. Anatomical localization of commensal bacteria in immune cell homeostasis and disease. *Immunol. Rev.*, 2014, vol. 260, iss. 1, pp. 35–49. doi: 10.1111/immr.12186

12. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, vol. 4, no.1, pp. 9.
13. Lazarevic V., Whiteson K., Hernandez D., François P., Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*, 2010, vol. 11:523. doi: 10.1186/1471-2164-11-523
14. Legendre P., Birks H.J.B., Lotter A.F., Juggins S., Smol J.P. From classical to canonical ordination. Tracking Environmental Change using Lake Sediments. Volume 5: Data handling and numerical techniques. Chapter 8. Eds: Birks H.J.B., Lotter A.F., Juggins S., Smol J.P. *Dordrecht: Springer*, 2012, pp. 201–248.
15. Obata T., Goto Y., Kunisawa J., Sato S., Sakamoto M., Setoyama H., Matsuki T., Nonaka K., Shibata N., Gohda M., Kagiya Y., Nochi T., Yuki Y., Fukuyama Y., Mukai A., Shinzaki S., Fujihashi K., Sasakawa C., Iijima H., Goto M., Umetsu Y., Benno Y., Kiyono H. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, vol. 107(16), pp. 7419–7424. doi: 10.1073/pnas.1001061107
16. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F., Kasikhina S.A., Lyadov K.V. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2009, vol. 21, pp. 159–171. doi: 10.3109/08910600903462657
17. Perry M., Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol. Today*, 1998, vol. 19, iss. 9, pp. 414–421. doi: 10.1016/S0167-5699(98)01307-3
18. Segata N., Kinder Haake S., Mannon P., Lemon K. P., Waldron L., Gevers D., Huttenhower C., Izard J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.*, 2012, vol. 13, R42. doi: 10.1186/gb-2012-13-6-r42
19. Sizova M.V., Hohmann T., Hazen A., Paster B.J., Halem S.R., Murphy C.M., Panikov N.S., Epstein S.S. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 1, pp. 94–203. doi: 10.1128/AEM.06813-11
20. Sonnenberg G.F., Monticelli L.A., Alenghat T., Fung T.C., Hutnick N.A., Kunisawa J., Shibata N., Grunberg S., Sinha R., Zahm A.M., Tardif M.R., Sathaliyawala T., Kubota M., Farber D.L., Collman R.G., Shaked A., Fouser L.A., Weiner D.B., Tessier P.A., Friedman J.R., Kiyono H., Bushman F.D., Chang K.M., Artis D. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*, 2012, vol. 336(6086), pp. 1321–1325. doi: 10.1126/science.1222551
21. Wong D.T. Salivaomics. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2012, vol. 143, suppl. 10, pp. 19S–24S. doi: 10.14219/jada.archive.2012.0339
22. Zaura E., Keijsers B.J., Huse S.M., Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.*, 2009, vol. 9:259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259

Авторы:

Бурмистрова А.Л., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, иммунологии и общей биологии, декан биологического факультета ФГБОУ ВО Челябинский государственный университет (ЧелГУ), г. Челябинск, Россия;
Филиппова Ю.Ю., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО ЧелГУ, г. Челябинск, Россия;
Нохрин Д.Ю., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО ЧелГУ, г. Челябинск, Россия;
Тимофеева А.В., зав. учебной лабораторией микробиологии и иммунологии, очный аспирант второго года обучения кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО ЧелГУ, г. Челябинск, Россия.

Authors:

Burmistrova A.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Dean of the Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;
Filippova Yu.Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;
Nokhrin D.Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation;
Timofeeva A.V., Head of the Educational Laboratory of Microbiology and Immunology, PhD Student, Department of Microbiology, Immunology and General Biology of the Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.07.2017
 Принята к печати 27.02.2017

Received 06.07.2017
 Accepted 27.02.2017

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ТРУДОВЫХ МИГРАНТОВ ИЗ СРЕДНЕЙ АЗИИ И ПОСТОЯННЫХ ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ РАЗЛИЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К НИМ

Л.А. Краева^{1,2}, Н.К. Токаревич¹, И.Н. Лаврентьева¹, Н.Г. Рощина¹,
Л.А. Кафтырева^{1,3}, Е.С. Кунилова¹, Н.Н. Курова¹, Н.А. Стоянова¹, А.Ю. Антипова¹,
А.В. Сварваль¹, Е.В. Зуева¹, А.А. Порин^{1,3}, Е.В. Рогачева⁴, И.Р. Желтакова¹,
И.В. Хамитова¹, Е.В. Тимофеева⁵, Г.И. Беспалова³

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБВОУ ВПО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Минобороны России, Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Управление Роспотребнадзора по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Широкие миграционные процессы, характерные для мегаполисов, в том числе Санкт-Петербурга, требуют всестороннего изучения инфицированности мигрантов, приезжающих по трудовой визе. Материал для исследований был взят у 370 мигрантов, прибывших в Санкт-Петербург по трудовой визе. Контрольная группа представлена 320 лицами взрослого населения Санкт-Петербурга. Методология исследования материала зависела от вида изучаемого возбудителя и включала в себя классические и современные методы исследования. Все полученные данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики. У трудовых мигрантов штаммы *C. diphtheriae* были выделены в 80 раз чаще, чем у постоянных жителей Санкт-Петербурга. У петербуржцев биовар *gravis* встречается в 25% случаев, у приезжего контингента — в 83% случаев, что является неблагоприятным прогностическим признаком. У мигрантов 17% штаммов *C. diphtheriae* имеют «молчаливый» ген токсигенности, который при известных условиях может возобновлять продукцию токсина. Местные жители защищены от дифтерии на 95%, а мигранты — лишь на 66%. У 17% трудовых мигрантов, носителей штаммов *C. diphtheriae*, определен низкий уровень защиты от дифтерии, что представляет угрозу для них и лиц, находящихся с ними в контакте. Инфицированность возбудителями бруцеллеза трудовых мигрантов из Узбекистана в 9 раз выше, чем местного населения, лиц из Таджикистана — в 60 раз выше. Показатель инфицированности трудовых мигрантов из Узбекистана и Таджикистана *C. burnetii* в 25 раз выше, чем у местного населения. Хроническое течение этих инфекций осложняет диагностику и снижает качество жизни. По результатам скринингового теста бактерионосительство *S. Typhi* распространено в 7 раз чаще у трудовых мигрантов из Узбекистана и в 2 раза — у лиц из Таджикистана, чем среди местного населения Санкт-Петербурга. Серопревалентность токсигенных *H. pylori* у трудовых мигрантов составляет 84%, что гораздо выше, чем у постоянных жителей Санкт-Петербурга (57%).

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lyudmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Библиографическое описание:

Краева Л.А., Токаревич Н.К., Лаврентьева И.Н., Рощина Н.Г., Кафтырева Л.А., Кунилова Е.С., Курова Н.Н., Стоянова Н.А., Антипова А.Ю., Сварваль А.В., Зуева Е.В., Порин А.А., Рогачева Е.В., Желтакова И.Р., Хамитова И.В., Тимофеева Е.В., Беспалова Г.И. Инфицированность трудовых мигрантов из Средней Азии и постоянных жителей Санкт-Петербурга возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 61–70. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70

Citation:

Kraeva L.A., Tokarevich N.K., Lavrentyeva I.N., Roshchina N.G., Kaftyreva L.A., Kunilova E.S., Kurova N.N., Stoyanova N.A., Antipova A.Yu., Svarval A.V., Zueva E.V., Porin A.A., Rogacheva E.V., Zheltakova I.R., Khamitova I.V., Timofeeva E.V., Bepalova G.I. Infection of labour migrants from Central Asia and residents of St. Petersburg and their susceptibility to various infectious diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 61–70. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-61-70

Причины этого явления не изучены и требуют дальнейшего исследования. У трудовых мигрантов из Средней Азии отмечается низкий уровень популяционного иммунитета к парвовирусной инфекции: 37% серопозитивных лиц из Узбекистана и 62% — из Таджикистана по сравнению с 78% у местного населения. Это может способствовать распространению парвовирусной инфекции с вовлечением в инфекционный процесс серонегативных постоянных жителей Санкт-Петербурга из групп риска, в том числе доноров крови, беременных женщин, лиц с иммунодефицитами, гематологических и онкологических больных. Полученные результаты констатируют напряженную эпидемиологическую ситуацию среди трудовых мигрантов Санкт-Петербурга по целому ряду инфекций. Достоверная информация поможет правильно организовать дальнейшее изучение проблемы и проведение соответствующих мероприятий по сохранению здоровья местного населения и приезжего контингента.

Ключевые слова: трудовые мигранты, дифтерия, бруцеллез, лихорадка Ку, лептоспироз, парвовирусная инфекция, хеликобактерная инфекция, брюшной тиф.

INFECTION OF LABOUR MIGRANTS FROM CENTRAL ASIA AND RESIDENTS OF ST. PETERSBURG AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO VARIOUS INFECTIOUS DISEASES

Kraeva L.A.^{a,b}, Tokarevich N.K.^a, Lavrentyeva I.N.^a, Roshchina N.G.^a, Kaftyreva L.A.^{a,c}, Kunilova E.S.^a, Kurova N.N.^a, Stoyanova N.A.^a, Antipova A.Yu.^a, Svarval A.V.^a, Zueva E.V.^a, Porin A.A.^{a,c}, Rogacheva E.V.^d, Zheltakova I.R.^a, Khamitova I.V.^a, Timofeeva E.V.^e, Bespalova G.I.^e

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Military Medical Academy named S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

^c North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

^d St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^e Office of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in St. Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Wide migration processes typical for megacities, including St. Petersburg, require a comprehensive study of the infection among migrants arriving on a work visa. Biological material for research was taken from 370 migrants who arrived in St. Petersburg on a work visa. The control group is represented by 320 adults of St. Petersburg. The methodology of the study of the biological material depended on the type of pathogen and included classical and modern methods of research. All obtained data are processed using adequate methods of mathematical statistics. *C. diphtheriae* strains in migrant workers were isolated 80 times more often than in permanent residents of St. Petersburg. In St. Petersburg *gravis* biovar occurs in 25% of cases, in the visiting contingent — in 83% of cases, which is an unfavorable prognostic sign. In migrants 17% of *C. diphtheriae* strains have a “silent” gene (tox+), which, under known conditions, can resume toxin production. The local people are protected from diphtheria by 95%, and labor migrant is only 66%. 17% of migrant workers with *C. diphtheriae* strains have a low level of protection against diphtheria, which poses a threat to them and those in contact with them. Infection with brucellosis pathogens of labor migrants from Uzbekistan is 9 times higher than the local population, persons from Tajikistan — 60 times higher. The infection rate of migrant workers from Uzbekistan and Tajikistan *C. burnetii* is 25 times higher than that of the local population. The chronic course of these infections complicates diagnosis and reduces the quality of life. According to the results of the screening test, *S. Typhi* bacterium carrier is distributed 7 times more in migrant workers from Uzbekistan and 2 times more in persons from Tajikistan than among the local population of St. Petersburg. The seroprevalence of toxic *H. pylori* in migrant workers is 84%, which is much higher than that of permanent residents of St. Petersburg (57%). The causes of this phenomenon have not been studied and require further study. Labor migrants from Central Asia have a low level of population immunity to parvovirus infection: 37% of seropositive persons from Uzbekistan and 62% from Tajikistan compared with 78% of the local population. This may contribute to the spread of parvovirus infection involving infection of seronegative residents of St. Petersburg risk groups, including blood donors, pregnant women, persons with immunodeficiencies, hematologic and oncologic patients. The results obtained ascertain the tense epidemiological situation among labour migrants in St. Petersburg for a number of infections. Reliable information will help to organize the correct further study of the problem and conduct appropriate measures to preserve the health of the local population and the visiting contingent.

Key words: labour migrants, diphtheria, brucellosis, zoonoses, leptospirosis, Parvovirus infection, Helicobacter infection, typhoid fever.

Введение

Особенностью последних лет является увеличение миграционных процессов населения по разным причинам. Санкт-Петербург как мегаполис не является исключением. По данным Управления Федеральной миграционной службы по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Северная столица ежегодно принимает

200–300 тыс. мигрантов. Большая часть из них приезжает из стран СНГ по трудовой визе.

О наличии социально значимых инфекционных заболеваний трудовых мигрантов (ТМ), которые обследуются в едином медицинском центре, есть необходимая информация, позволяющая оценивать эпидемиологические риски распространения этих заболеваний среди ТМ и постоянных жителей Санкт-Петербурга (ПЖ

СПб). Так, ретроспективными исследованиями ряда авторов показано, что инфицированность вирусом иммунодефицита человека, заболеваемость туберкулезом, острыми кишечными инфекциями, сифилисом в 5–30 раз чаще встречается у ТМ, чем у ПЖ СПб [7, 16, 22].

При этом нет никаких данных о заболеваемости приезжего контингента воздушно-капельными, зоонозными, антропонозными, кишечными и другими инфекциями. А между тем известно, что бруцеллез, лихорадка Ку, лептоспироз и брюшной тиф всегда были широко распространены в Средней Азии, откуда приезжает большинство ТМ. Исследования на дифтерию среди приезжих также не проводятся. В то же время известно, что в последние годы увеличивается заболеваемость дифтерией в европейских странах после 15 лет стабильно благополучной ситуации. Так, в 2016 г. зарегистрировано 9 случаев дифтерии в Германии [25], 8 — во Франции [35], 6 — в Бельгии [26], 4 — в Швеции [27], по 2 случая дифтерии в Норвегии и Австрии [28], 1 — в Великобритании [31]. Причем большинство случаев были привезены беженцами или местным населением перечисленных стран, побывавшим в деловых или туристических поездках в странах Африки и Ближнего Востока с высокой заболеваемостью дифтерией.

В Санкт-Петербурге наибольшее количество приезжих составляют ТМ из Узбекистана и Таджикистана. По официальным данным в этих странах отсутствуют случаи дифтерии. Однако исследованиями ВОЗ, проведенными в 2010 г., было установлено, что более половины населения Таджикистана не защищено от дифтерии. Данные по Узбекистану вообще отсутствуют. И если для стран Западной Европы наибольшее значение имеет завоз дифтерии из Африканского континента, то для России он может произойти из Среднеазиатских республик, особенно тех, что граничат со странами, эндемичными по дифтерии. Как известно, наибольшая заболеваемость дифтерией отмечается в Индии, Пакистане, Мьянме, Непале, из которых возможен занос инфекции в Таджикистан и Узбекистан [24]. Также высокая заболеваемость регистрируется в Иране, откуда через Туркменистан дифтерия может быть завезена в Узбекистан.

К инфекциям с медико-социальной значимостью относят и парвовирусную В19 инфекцию (инфекционную эритему). В настоящее время регистрация парвовирусной инфекции (ПВИ) в РФ и странах ближнего зарубежья отсутствует. В одном из немногих исследований по выявлению случаев ПВИ на территориях РФ показано широкое распространение инфекции в Северо-Западном федеральном округе и, в частности, в Санкт-Петербурге [2]. ПВИ распространяется в организованных коллективах (детские сады, школы, интернаты), в местах скученного проживания, в семьях [18]. В подавляющем большин-

стве (около 80%) случаев клинически выраженная ПВИ протекает в легкой форме, а у взрослых в 20–50% случаев развивается бессимптомная форма заболевания. Эти клинические особенности затрудняют выявление инфекции, способствуют ее распространению, что представляет особую опасность для беременных женщин, лиц с иммунодефицитными состояниями, больных гематологического профиля. У них инфицирование ПВИ может спровоцировать гепатиты, тяжелые формы анемии, скоротечный апластический криз, вплоть до летального исхода [3, 21].

Учитывая тенденцию последних лет в отношении путей распространения инфекций, большое количество мигрантов в Санкт-Петербурге из стран Средней Азии и отсутствие достоверных сведений о заболеваемости у них дифтерией, брюшным тифом, парвовирусной и зоонозными инфекциями, авторы статьи сочли необходимым обозначить следующую цель исследовательской работы: изучить инфицированность различными возбудителями инфекционных болезней ТМ из Средней Азии и ПЖ СПб для усовершенствования профилактики заболеваний.

Материалы и методы

Материал для исследований был взят у 370 мигрантов, прибывших в Санкт-Петербург по трудовой визе. Контрольная группа представлена 320 лицами взрослого населения (20–50 лет) Санкт-Петербурга. Структура ТМ по странам представлена следующим образом: 70% — из Узбекистана, 22% — из Таджикистана, 8% — из Украины, Молдовы, Азербайджана, Турции. Структура ТМ по полу: 86% — мужчины, 14% — женщины. Структура ТМ по возрасту: лица 18–30 лет составляют 33%, 31–40 лет — 29%, 41–50 лет — 25%, старше 50 лет — 13%. Таким образом, 87% ТМ составляют взрослые лица до 50 лет.

При исследовании на дифтерийную инфекцию материалом служили мазки из зева и носа — на наличие *C. diphtheriae*, образцы крови — на наличие антитоксических противодифтерийных антител. Мазки из зева и носа исследовали на *C. diphtheriae* согласно МУК 4.2.3065-13. Биохимическое типирование выделенных коринебактерий осуществляли с помощью тест-системы Api Coryne (Biomerieux). Также в работе применяли масс-спектрометрический анализ с использованием технологии MALDI-TOF на масс-спектрометре Biotyper (Bruker, Германия) с автоматической программой Bruker Taxonomy. Токсигенность штаммов *C. diphtheriae* определяли в Elek-тесте, ген токсинопродукции выявляли в полимеразной цепной реакции по инструкции из набора «АмплиСенс» (Москва).

Антитоксические противодифтерийные антитела определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с помощью эритроцитарного дифтерийного антигенного жидкого диагности-

кума производства «Биомед» им. И.И. Мечникова (Московская область, Красногорский район, с. Петрово-Дальнее) согласно МУ 3.1.2943-11 и в иммуноферментном анализе (ИФА) с помощью набора для определения суммарных анти-токсических антител на основе конъюгата — иммуноглобулинов (F(ab')₂-фрагментов) против IgG человека, аффинно очищенных, меченных пероксидазой (производства НПО «Биомед», г. Пермь) согласно МР 3.1.2.0105-15.

Для обнаружения антител к возбудителю бруцеллеза применяли тест-систему «Бруцелла-антитела-ИФА-БЕСТ» производства АО «ВЕКТОР-БЕСТ». Постановку ИФА и оценку результатов проводили в соответствии с инструкциями изготовителя. Определение IgG-антител к *Coxiella burnetii* осуществляли с помощью разработанной авторами статьи иммуноферментной тест-системы [4]. Серологические исследования на лептоспироз проводили в реакции микроагглютинации (РМА), остающейся в настоящее время референтным тестом, с набором живых эталонных штаммов лептоспир 10 серологических групп: *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Canicola*, *Autumnalis*, *Australis*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Bataviae*, *Tarassovi*, в соответствии с МУ 3.1.1128-02 [5].

Для выявления хронических бактерионосителей сыворотки крови исследовали на наличие антител к Vi-антигену возбудителя брюшного тифа (первичный скрининг возможного носителя) микрометодом в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА). Использовали набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный Vi-антигенный для РПГА (СЭД-Vi)» производства ФБУН НИИЭМ имени Пастера. Исследование проводили в 2 этапа. На этапе скрининга использовали качественный вариант реакции; при получении положительного результата (уровень антител к Vi-антигену выше/равно 1:40) проводили количественные исследования (определение уровня IgG к Vi-антигену *S. Typhi*).

Наличие антител IgG к токсину CagA *Helicobacter pylori* исследовали иммуноферментным методом (DRG Unstrumts GmbH, Германия).

В работе изучены следующие лабораторные маркеры ПВИ: IgG-антитела к PV B19 и ДНК вируса. Иммуноглобулины класса G выявляли в ИФА с тест-системой *resomWell Parvovirus B19 IgG* (Microgen Diagnostic, Microgen GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией. Для выделения и количественного определения ДНК PV B19 из образцов крови использовали наборы реагентов «ДНК-сорб-АМ» *AmpliSens* и «АмплиСенс® Parvovirus B19-FL» производства ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (Москва).

Все полученные данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики.

Результаты

У ТМ штаммы *C. diphtheriae* были выделены в 1,6% случаев, в контрольной группе из населения Санкт-Петербурга не было выделено ни одного штамма. Поэтому воспользовались данными Управления Роспотребнадзора по Санкт-Петербургу о профилактических исследованиях за весь год. Оказалось, что у местного населения Санкт-Петербурга штаммы *C. diphtheriae* выделяли в 0,02% случаев, то есть в 80 раз реже. От ТМ из Узбекистана получено 83% штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в целом от ТМ, от приезжих из Таджикистана — 17%. У петербуржцев биовар *gravis* встречается в 25% случаев, у приезжего контингента — в 83% случаев ($p < 0,001$), причем большинство — из Самаркандской области.

После проведения масс-спектрометрического анализа выделенных штаммов коринебактерий с использованием технологии MALDI-TOF была осуществлена иерархическая кластеризация полученных спектров с использованием алгоритма попарного арифметического среднего (UPGMA) для определения связи между кластерами. В качестве меры расстояния между отдельными масс-спектрами применяли коэффициент корреляции Пирсона между переменными значениями интенсивности пиков в спектральных профилях (рис.).

В фенотипическом Elek-тесте все выделенные штаммы не проявляли токсигенных свойств. В полимеразной цепной реакции 17% штаммов оказались положительными (несущими «молчащий» ген токсигенности).

Результаты изучения специфического анти-токсического противодифтерийного иммунитета показали, что ПЖ СПб защищены от дифтерии на 95%, в то время как прибывшие на работу ТМ — лишь на 66% ($p < 0,001$). Средний уровень суммарных анти-токсических антител у ТМ составляет 0,56 МЕ/мл, у ПЖ СПб — 0,82 МЕ/мл. Средний индекс avidности анти-токсических противодифтерийных антител у ТМ составляет 38%, у ПЖ СПб — 56% ($p < 0,01$) в то время как защитный индекс avidности соответствует 30%. Для ТМ из всех стран характерно, что половина лиц (50%) имеют защитный уровень антител, а половина (50%) имеет минимальную (7%) или некоторую степень защиты (43%) от дифтерии. Возрастных особенностей при изучении уровней антител не выявлено.

Донорами ТМ являются все административно-территориальные единицы Узбекистана и Таджикистана. Но не во всех областях налажена работа по вакцинации населения. Косвенным показателем этого могут служить следующие данные: наиболее низкие уровни антител имеют ТМ из Кашкадарьинской области Узбекистана, а наиболее высокие — из Бухарской области. Самаркандская область, у представителей которой выделено наибольшее количество штаммов *C. diphtheriae*, имеет пока-

затели, как средние по всей стране. Худшие показатели по уровню защищенности от дифтерии у ТМ из Таджикистана отмечены в Халтонской области. Все остальные области не имеют существенных различий между собой.

Исследование сывороток ТМ на зоонозные инфекции позволило выявить антитела ко всем трем возбудителям. Так, инфицированность возбудителями бруцеллеза ТМ из Узбекистана составила 1,8%, а среди ТМ из Таджикистана — 13,8%, что выше, чем ПЖ СПб в 9 и 60 раз соответственно ($p < 0,001$). Показатель инфицированности жителей мегаполиса *C. burnetii* носит весьма стабильный характер в течение многих лет и составляет 0,4% от числа обследованных. Напротив, у ТМ из Узбекистана и Таджикистана этот показатель в 25 раза выше, чем у местного населения ($p < 0,001$). Инфицированность лептоспирами ТМ из Узбекистана, Таджикистана и жителей Санкт-Петербурга практически не различалась и составила 2,7; 3,4 и 3,0% соответственно.

При скрининговом выявлении хронических бактерионосителей *S. Typhi* положительный результат был получен в 24 образцах сывороток крови ТМ. Подтверждающий тест показал наличие антител в 9 сыворотках к Vi-антигену в диагностическом титре. Положительные результаты были получены у 2 граждан Таджикистана и 7 граждан Узбекистана, что составляет 3,6 и 4,1% от числа обследованных граждан этих стран соответственно ($p < 0,05$).

При исследовании сывороток крови в контрольной группе положительный результат при скрининге был получен лишь в 1 случае, а уровень IgG к Vi-антигену *S. Typhi* был ниже 1:10.

В образцах сывороток крови ТМ в 84% случаев обнаружены антитела к токсигенным штаммам *H. pylori*. При этом относительно высокие показатели превалентности *H. pylori* обнаружены во всех возрастных группах, но максимальны среди 41–50-летних — 87%. При сравнении данных показателей у ТМ и ПЖ СПб выявлено, что серопревалентность токсигенных *H. pylori* у последних значительно ниже: у ПЖ СПб она равна 57%, у ТМ — 84% ($p < 0,05$).

Результаты лабораторного обследования на маркеры ПВИ показали, что наименьшая доля серопозитивных к PV B19 лиц выявлена среди ТМ из Узбекистана (37%), среди приезжих из Таджикистана она составила 62% ($p < 0,01$). Гендерных различий среди серопозитивных лиц в этих двух группах не выявлено. Среди обследованных ПЖ СПб доля лиц с IgG-антителами к PV B19 существенно выше (78%) с преобладанием серопозитивных мужчин (81%) против 60% серопозитивных женщин. При анализе возрастной структуры серопозитивных к PV B19 лиц выявлено увеличение их доли в старших возрастных группах среди ТМ и у доноров Санкт-Петербурга, что соответствует известным литературным данным [9].

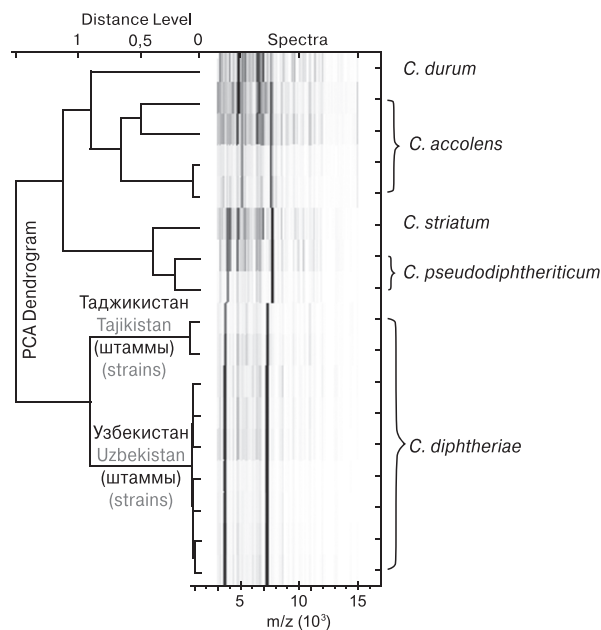


Рисунок. Иерархическая кластеризация MALDI-TOF спектров штаммов *Corynebacterium*, выделенных у трудовых мигрантов из Средней Азии

Figure. Hierarchical clustering of MALDI-TOF spectrums of strains *Corynebacterium*, isolated from Central Asia labor migrants

При этом в сыворотках крови обследованных ТМ из Узбекистана доля IgG-положительных образцов увеличивалась с 20% в возрастной группе 18–20 лет до 36% (21–30 лет) и сохранялась на уровне 35–36% у лиц в возрасте до 50 лет. В сыворотках крови ТМ из Таджикистана 18–20 лет все обследованные оказались серонегативны к PV B19; далее отмечено увеличение доли IgG-положительных сывороток крови в каждой возрастной группе: от 57% (21–30 лет) до 85% (41–50 лет) ($p < 0,05$).

В группе сравнения (доноры крови) высокое количество серопозитивных лиц отмечено уже среди лиц 18–20 лет (70%); далее этот показатель увеличивался и в возрастной группе 31–40 лет достиг 100%, несколько снизившись (до 89%) у лиц в возрасте 41–50 лет.

Часть сывороток крови, в которых были выявлены IgG-антитела, были исследованы на наличие ДНК к PV B19. Наибольшее количество ДНК+ образцов (25%) выявлено в сыворотках крови доноров Санкт-Петербурга с максимальной долей положительных находок среди лиц 18–20 лет (52%). Эти образцы характеризовались высоким уровнем вирусной нагрузки — до 10^8 копий/мл, что свидетельствует о недавнем перенесенной ПВИ. Напротив, среди образцов, полученных от ТМ, доля ДНК+ к PV B19 проб оказалась достоверно ниже. Среди ТМ из Узбекистана она составила 12%, из Таджикистана — 3,6% ($p <$

0,05). При этом вирусная нагрузка в ДНК положительных образцах от ТМ оказалась низкой (не более 10^3 копий/мл).

Обсуждение

После эпидемии дифтерии конца XX в. в странах бывшего Советского Союза доля варианта *gravis* среди биологических вариантов *C. diphtheriae* снижалась и в большинстве регионов была почти полностью вытеснена вариантом *mitis*. В Санкт-Петербурге доля варианта *gravis* не превышает 25% от всех выделенных штаммов, в то время как у ТМ она составляет 83%. Как известно, нарастание доли варианта *gravis* в структуре штаммов *C. diphtheriae* является неблагоприятным прогностическим признаком [29].

Масс-спектрометрический анализ штаммов *C. diphtheriae*, выделенных от ТМ, позволил провести иерархическую кластеризацию полученных спектров. Наиболее близкими между собой оказались штаммы, выделенные у ТМ из Узбекистана. Причем, большинство из них были привезены из Самаркандской области. Статистически значимые отличия от них имели штаммы, выделенные от ТМ из Таджикистана. Полученные данные говорят о мере биологической близости (или удаленности) штаммов, выделенных от ТМ, приехавших из разных стран, и о возможности использования данных масс-спектрометрического анализа для эпидемиологических целей.

Выявление гена (*tox+*) у некоторых фенотипически нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, выделенных от ТМ, подтверждает общую закономерность циркуляции таких штаммов с «молчащим» геном в структуре всех штаммов. В разных регионах и в разные годы доля таких штаммов колеблется от 10–12 до 55% [14]. Как известно, у штаммов с «молчащим» геном в определенных условиях может возобновляться продукция токсина. Поэтому в случаях выделения у пациента штамма даже с «молчащим» геном существует опасность возобновления токсинопродукции.

Как показали результаты исследования, у ТМ отмечается низкий уровень защиты от дифтерии по суммарному количеству антитоксических противодифтерийных антител и по авидности [6]. Выявлен факт неустойчивого специфического иммунитета по обоим показателям у половины ТМ. Более того, у 17% лиц — носителей штаммов *C. diphtheriae* определены низкие уровни антитоксических антител и авидности. Эти лица несут угрозу даже для самих себя в плане возможности развития инфекции.

Существенные различия в инфицированности бруцеллами и коксиеллами ТМ по сравнению с ПЖ СПб позволяют с большой вероятностью предположить, что заражение произошло вне мегаполиса, что косвенно подтверждается широким распространением бруцеллеза и коксиел-

леза в Узбекистане и Таджикистане. Последнее связано с социально-экономическим укладом и переводом поголовья сельскохозяйственных животных из коллективных в индивидуальные хозяйства. Происходит снижение эффективности профилактических противозооотических и противэпидемических мероприятий, и эти инфекции приобретают характер эпидемического распространения [8, 12].

Инфицирование ТМ лептоспирами, вероятно, произошло в Санкт-Петербурге. Подтверждением этому являются практически не различающиеся между собой показатели инфицированности этим патогеном ТМ и ПЖ СПб. Кроме того, у ТМ выявлены антитела к лептоспирам серогрупп *Icterogemorrhagiae* и *Canicola*, которые характерны для этиологии лептоспироза в Санкт-Петербурге [17, 20]. Возможность заражения ТМ лептоспирами в Санкт-Петербурге обусловлена характером выполняемой ими работы: низкоквалифицированный труд на стройках, рынках (грузчики), в системе коммунального хозяйства (дворники, уборщики мусора), а также не всегда благоприятные условия проживания не исключают вероятность контакта с синантропными грызунами, которые, как известно, в условиях города являются источником инфекции более чем для 30% заболевших [11].

Человек, как правило, является биологическим (экологическим) тупиком для возбудителей зооантропонозов, поэтому, в отличие от антропонозов, реальной опасности для ПЖ СПб мигранты, инфицированные в прошлом возбудителями лептоспироза, лихорадки Ку и бруцеллеза, не представляют. Однако перечисленные патогены в ряде случаев длительно персистируют в организме человека и могут вызывать хроническое течение болезни. Так, при бруцеллезе хроническая форма инфекции составляет 40–60% с дальнейшей инвалидизацией больных [15]. Хроническая форма — весьма частый исход и лихорадки Ку: на юге Франции от 5 до 8% случаев эндокардитов обусловлены *Coxiella burnetii* [36]. Лечение коксиеллезного эндокардита требует длительного применения дорогостоящих терапевтических препаратов, в ряде случаев — хирургического вмешательства [19, 23]. При лептоспирозной инфекции патологический процесс может принимать затяжное течение у 5% больных [1]. При заболеваниях неясной этиологии ТМ необходимо обследовать, в том числе на бруцеллез, лихорадку Ку и лептоспироз. Особую настороженность врачей должны вызывать артриты, бурситы, артрозы и спондилоартрозы, характерные для хронического течения бруцеллеза, эндокардиты и хронические пневмонии, характерные для лихорадки Ку, а также нарушения функции печени, почек, органов зрения (ириты, иридоциклиты), нервной и сердечно-сосудистой систем, возникающие после перенесенного лептоспироза.

Проведенное исследование подтверждает факт повсеместного распространения ПВИ. Вместе с тем, невысокая контагиозность заболевания объясняет различия в частоте выявления лабораторных маркеров ПВИ у ПЖ СПб и ТМ из стран Средней Азии. При отсутствии специфической профилактики очевидно наличие постоянной циркуляции парвовируса В19. В таком крупном мегаполисе, как Санкт-Петербург, с высокой плотностью населения, выраженными внутренними миграционными процессами, с высокой долей организованных детей, с большим количеством средних и высших образовательных учреждений (в том числе военных), с проживанием иногородних студентов в общежитиях и казармах, создаются условия для возникновения и широкого распространения ПВИ. Это подтверждается высокой долей лиц, инфицированных ДНК парвовируса В19, среди доноров крови — курсантов военного училища. Широкое распространение ПВИ в Санкт-Петербурге подтверждается проведенными ранее исследованиями [9]. Однако почти в каждой возрастной группе выявлены лица, чувствительные к инфицированию РV В19. В частности, ранее было показано, что среди 210 обследованных беременных женщин, проживающих в Санкт-Петербурге, около 50% чувствительны к заражению РVВ19 [2].

Видимо, обследованные ТМ прибыли из районов с невысокой плотностью населения, слабо выраженной внутренней миграцией, небольшим количеством средних и высших учебных заведений. Очевидно, этим объясняется существенно меньшее количество серопозитивных к РV В19 лиц среди граждан Узбекистана и Таджикистана по сравнению с ПЖ СПб. ТМ с низким уровнем популяционного иммунитета являются мишенью для инфицирования РV В19. Скученность проживания этих этнических общин, характерная для их пребывания в Санкт-Петербурге, может способствовать активному распространению ПВИ среди ТМ с вовлечением в инфекционный процесс чувствительных к инфицированию ПЖ СПб, в том числе доноров крови, беременных женщин, лиц с первичными и вторичными иммунодефицитами, больных анемиями, реципиентов крови и костного мозга, онкологических больных.

Более высокая серопревалентность токсигенных *H. pylori* у ТМ, чем у ПЖ СПб (в 1,5 раза), может быть обусловлена разными социально-экономическими условиями проживания населения, а также этническими различиями в укладе жизни [30, 37].

Заключение

Активная циркуляция штаммов *C. diphtheriae* среди ТМ, распространение биохимического варианта *gravis*, наличие штаммов с «молчащим» геном, недостаточная защищенность ТМ от диф-

терии, высокая скученность их в местах временного проживания, социально-экономические трудности во время проживания, недостаточная доступность медицинских услуг — все эти факторы свидетельствуют о неблагоприятной ситуации в отношении дифтерийной инфекции среди ТМ и требуют проведения определенных мероприятий, направленных на предупреждение эпидемиологической нестабильности в Санкт-Петербурге.

Впервые полученные данные о распространении инфекции, обусловленной *H. pylori*, среди мигрантов из Средней Азии, представляют определенный интерес в связи с полным отсутствием информации по данному вопросу. Необходимо проведение более глубокого изучения влияния этой инфекции на здоровье ТМ и ее распространения среди жителей Санкт-Петербурга.

Присутствие в Санкт-Петербурге ТМ из Средней Азии с низким уровнем иммунитета к ПВИ может способствовать распространению инфекции с вовлечением в инфекционный процесс серонегативных ПЖ СПб из групп риска, в том числе доноров крови, беременных женщин, лиц с иммунодефицитами, гематологических и онкологических больных.

Инфицированность возбудителями бруцеллеза и коксиеллеза ТМ значительно выше, чем у ПЖ СПб. Хроническое течение, характерное для бруцеллеза и коксиеллеза, и длительно сохраняющиеся после перенесенного лептоспироза патологические изменения, снижают качество жизни ТМ, ухудшают их работоспособность и повышают нагрузку на медицинские учреждения Санкт-Петербурга. При обращении ТМ за медицинской помощью следует исключать обострение хронического течения болезней, вызванных *Brucella* и *C. burnetii*. Поэтому при наличии соответствующих симптомов этих лиц надо обследовать на бруцеллез и лихорадку Ку.

Проведенные исследования позволили в общих чертах оценить уровни инфицированности ТМ возбудителями различных инфекционных заболеваний и восприимчивость к ним по сравнению с показателями для ПЖ СПб. Полученные результаты помогут правильно организовать дальнейшее изучение проблемы и проведение соответствующих мероприятий по сохранению здоровья местного населения и приезжего контингента.

Благодарности

Выражаем искреннюю благодарность руководителю и сотрудникам Управления Роспотребнадзора по г. Санкт-Петербургу Н.С. Башкетовой, И.Г. Чхинджерии, руководителю и сотрудникам ООО «Единый медицинский центр» г. Санкт-Петербурга за помощь в организации сбора материала от мигрантов, прибывающих в Санкт-Петербург по трудовой визе.

Список литературы/References

1. Авдеева М.Г. Исходы и течение отдаленной реконвалесценции при иктерогеморрагическом лептоспирозе // Клиническая медицина. 2003. № 6. С. 42–47. [Avdeeva M.G. Outcomes and course of distant convalescence in icterohemorrhagic leptospirosis. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2003, no. 6, pp. 42–47. (In Russ.)]
2. Антипова А.Ю., Лаврентьева И.Н., Бичурина М.А., Лялина Л.В., Кутуева Ф.Р. Распространение парвовирусной инфекции в Северо-Западном федеральном округе России // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 4. С. 44–48. [Antipova A.Yu., Lavrentieva I.N., Bichurina M.A., Lyalina L.V., Kutueva F.R. Distribution of parvovirus infection in the North-West Federal District of Russia. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 44–48. doi: 10.22625/2072-6732-2011-3-4-44-48 (In Russ.)]
3. Васильев В.В., Мурина Е.А., Сидоренко С.В., Мукомолова А.Л., Куюмчян С.Х., Воронина О.Л., Мирошниченко И.Г., Мацко В.А. Парвовирусная (B19V) инфекция у беременных и детей раннего возраста // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 4. С. 26–33. [Vasilyev V.V., Murina E.A., Sidorenko S.V., Mukomolova A.L., Kuyoumchyan S.H., Voronina O.L., Miroshnichenko I.G., Matsko V.A. Parvovirus (B19V) infection in pregnant and young children. *Zhurnal infektologii = Journal Infectology*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 26–33. doi: 10.22625/2072-6732-2011-3-4-26-33 (In Russ.)]
4. Горбачев Е.Н., Токаревич Н.К. Изучение иммунного ответа у больных и переболевших Ку-лихорадкой при использовании иммуноферментного анализа // Журнал микробиологии. 1995. № 3. С. 99–102. [Gorbachev E.N., Tokarevich N.K. The study on immune response in patients who had recovered from Q fever when using the enzyme immunoassay. *Zhurnal mikrobiologii = Journal of Microbiology*, 1995, no. 3, pp. 99–102. (In Russ.)]
5. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян А.А. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 6. С. 28–36. [Zueva E.V., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Totolian A.A. MALDI-TOF mass-spectrometric analysis of *Leptospira* spp. used in serodiagnosis of leptospirosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 6, pp. 28–36. (In Russ.)]
6. Краева Л.А., Ценева Г.Я., Николаева А.М., Алексеева Е.А. Роль высокоavidных антитоксических антител в оценке невосприимчивости к дифтерийной инфекции // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2011. № 4. С. 27–31. [Kraeva L.A., Tseneva G.Ya., Nikolaeva A.M., Alekseeva E.A. The role of highly antitoxic antibodies in assessing immunity to diphtheria infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2011, no. 4, pp. 27–31. (In Russ.)]
7. Кунгуров Н.В., Уфимцева М.А., Малишевская Н.П., Сырнева Т.А., Струин Н.Л., Сурганова В.И. Эпидемиологическая роль мигрантов в распространении сифилиса на территориях Урала, Сибири и Дальнего Востока // Вестник дерматологии и венерологии. 2010. № 2. С. 4–9. [Kungurov N.V., Ufimtseva M.A., Malishevskaya N.P., Syrneva T.A., Struin N.L., Sarganova V.I. The epidemiological role of migrants in the spread of syphilis in the territories of the Urals, Siberia and the Far East. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2010, no. 2, pp. 4–9. (In Russ.)]
8. Курбанов К.М., Сатаров С.С., Ситмонова Е.Г., Филатов Н.Н. Современные эпизоотолого-эпидемиологические особенности бруцеллеза в республике Таджикистан // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 3. С. 31–37. [Kurbanov K.M., Satarov S.S., Sitmonova E.G., Filatov N.N. Modern epizootologic and epidemiological features of brucellosis in the Republic of Tajikistan. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2016, no. 3, pp. 31–37. (In Russ.)]
9. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю. Парвовирус В19 человека: характеристика возбудителя, распространение и диагностика обусловленной им инфекции // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 4. С. 311–322. [Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu. Parvovirus B19: characteristics of the pathogen, distribution and diagnosis of the infection caused by it. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 311–322. doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-311-322 (In Russ.)]
10. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Бичурина М.А., Семенов А.В. Генотипирование изолятов парвовируса В19, циркулирующих в Северо-Западном федеральном округе России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 6. С. 36–43. [Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Bichurina M.A., Semenov A.V. Genotyping of parvovirus B19 isolates circulating in Northwestern Federal District of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 36–43. (In Russ.)]
11. Майорова С.О., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Федуняк И.П. Клинико-эпидемиологические особенности лептоспирозной инфекции в Санкт-Петербурге // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2007. № 1. С. 12–15. [Mayorova S.O., Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Fedunyak I.P. Clinical and epidemiological features of leptospirosis infection in Saint Petersburg. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2007, no. 1, pp. 12–15. (In Russ.)]
12. Наврузшоева Г.Ш., Девришов Д.А. Эпизоотическая ситуация по бруцеллезу в Республике Таджикистан // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017. № 6. С. 68–64. [Navruzshoeva G.Sh., Devrishov D.A. Epizootic situation on brucellosis in the Republic of Tajikistan. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya = Veterinary Science, Zootechny and Biotechnology*, 2017, no. 6, pp. 68–64. (In Russ.)]
13. Ниязматов Б.И., Ахмедова М.Д., Бабаходжаев С.Н. Эпидемиологический надзор за дифтерией в Республике Узбекистан // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010. № 2. С. 11–14. [Niyazmatov B.I., Akhmedova M.D., Babakhodzhaev S.N. Epidemiological surveillance of diphtheria in the Republic of Uzbekistan. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2010, no. 2, pp. 11–14. (In Russ.)]
14. Подаваленко А.П., Чумаченко Т.А., Глушкевич Т.Г., Шумакова Л.Л. Мониторинг микроорганизмов рода *Corynebacterium* в разные периоды интенсивности эпидемического процесса дифтерии // Медицина сегодня и завтра. 2012. № 3–4. С. 56–57. [Podavalenko A.P., Chumachenko T.A., Glushkevich T.G., Shumakova L.L. Monitoring of microorganisms of the genus *Corynebacterium* in different periods of the intensity of the epidemic process of diphtheria. *Meditsina segodnya i zavtra = Medicine Today and Tomorrow*, 2012, no. 3–4, pp. 56–57. (In Russ.)]

15. Сафонов А.Д. Современный взгляд на клинические классификации бруцеллеза // Инфекционные болезни. 2011. Т. 9, № 2. С. 106–109. [Safonov A.D. Modern view on clinical classification of brucellosis. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 106–109. (In Russ.)]
16. Софронов А.Г., Добровольская А.Е., Пашковский В.Э., Чашин В.П., Чашин М.В., Зуева Л.П., Асланов Б.И., Гончаров А.Е. Распространенность социально-значимых инфекционных заболеваний у трудовых мигрантов в Санкт-Петербурге // Медицинский академический журнал. 2014. Т. 14, № 4. С. 79–83. [Sofronov A.G., Dobrovolskaya A.E., Pashkovsky V.E., Chashchin V.P., Chashchin M.V., Zueva L.P., Aslanov B.I., Goncharov A.E. Prevalence of socially significant infectious diseases in labor migrants in St. Petersburg. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, vol. 14, no. 4, pp. 79–83. (In Russ.)]
17. Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Майорова С.О., Грачева Л.И. Лептоспирозы: пособие для врачей. Под ред. Ананыиной Ю.В. СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2010. 116 с. [Stoyanova N.A., Tokarevich N.K., Mayorova S.O., Gracheva L.I. *Leptospirozy: posobie dlya vrachei*. Pod red. Ananyinoy Yu.V. [Leptospirosis: a manual for medical doctors. Ed. Ananyina Yu.V.]. *St. Petersburg: Pasteur Institute*, 2010, 116 p.]
18. Тихонова Н.Т., Герасимова А.Г., Москалева Т.Н. Оценка распространения парвовирусной инфекции в Москве // Информационное письмо Комитета здравоохранения г. Москвы. М., 2004. № 11. 12 с. [Tikhonova N.T., Gerasimova A.G., Moskaleva T.N. Otsenka rasprostraneniya parvovirusnoy infektsii v Moskve. Informatsionnoe pis'mo Komiteta zdravookhraneniya [Evaluation of the spread of parvovirus infection in Moscow. Information letter of the Health Committee of Moscow]. *Moscow*, 2004. No. 11. 12 p.]
19. Токаревич Н.К. Активность лекарственных препаратов в отношении *Coxiella burnetii* – возбудителя Ку-лихорадки // Антибиотики и химиотерапия. 2007. Т. 52, № 1–2. С. 46–56. [Tokarevich N.K. Activity of medicines against *Coxiella burnetii* – causative agent of Q fever. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2007, vol. 52, no. 1–2, pp. 46–56. (In Russ.)]
20. Токаревич Н.К., Стоянова Н.А. Эпидемиологические аспекты антропогенного влияния на эволюцию лептоспирозов // Инфекция и иммунитет. 2011. Т. 1, № 1. С. 67–76. [Tokarevich N.K., Stoyanova N.A. Epidemiological aspects of anthropogenic impact on the evolution of leptospirosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 67–76. doi: 10.15789/2220-7619-2011-1-67-76 (In Russ.)]
21. Филатова Е.В., Новикова Н.А., Зубкова Н.В., Голицына Л.Н., Кузнецов К.В. Определение маркеров парвовируса В19 в образцах крови доноров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2010. № 5. С. 67–70. [Filatova E.V., Novikova N.A., Zubkova N.V., Golitsyna L.N., Kuznetsov K.V. Determination of markers of parvovirus B19 in blood samples of donors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, no. 5, pp. 67–70. (In Russ.)]
22. Яковлев А.А., Котлярова С.И., Мусатов В.Б., Федуняк И.П., Карнаухов Е.В., Лукашевич Э.Н., Мусатова Е.В. Инфекционная заболеваемость мигрантов и туристов в Санкт-Петербурге // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 4. С. 49–54. [Yakovlev A.A., Kotlyarova S.I., Musatov V.B., Fedunyak I.P., Karnaukhov E.V., Lukashevich E.N., Musatova E.V. Infectious morbidity of migrants and tourists in St. Petersburg. *Zhurnal infektsiologii = Journal Infectology*, 2011, vol. 3, no. 4, pp. 49–54. doi: 10.22625/2072-6732-2011-3-4-49-54 (In Russ.)]
23. Anderson A., Bijlmer H., Fournier P., Graves S., Hartzell J. Diagnosis and management of Q fever – United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR*, 2013, vol. 62, no. 35, 28 p.
24. Benu N., Tulika G.M. Investigation of an outbreak of diphtheria in Borborooah block of Dibrugarh District. Assam. *Indian J. Community Med.*, 2010, vol. 35, no. 3, pp. 436–438. doi: 10.4103/0970-0218.6
25. Berg L., Mechlin A., Schultz E.S. Cutaneous diphtheria after a minor injury in Sri Lanka. *Der Hautarzt*, 2016, vol. 67, iss. 2, pp. 169–172. doi: 10.1007/s00105-015-3718-6
26. European Centre for Disease Prevention and Control. A fatal case of diphtheria in Belgium. Rapid Risk Assessment: ECDC, 2016. pp. 1–10. URL: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/RRR-Diphtheria-Belgium.pdf> (06.03.2018)
27. Fredlund H.N., Noren T., Lepp T., Morfeldt E., Normark B.H. A case of diphtheria in Sweden. *Eurosurveillance*, 2011, vol. 16, no. 50, pp. 1–4. doi: 10.2807/ese.16.50.20038-en
28. Jakovljevic A., Steinbakk M., Mengshoel A.T., Sagvik E., Brugger-Synnes P., Sakshaug T., Ronning K., Blystad H., Bergh K. Imported toxigenic cutaneous diphtheria in a young male returning from Mozambique to Norway. *Eurosurveillance*, 2014, vol. 19, no. 24, pp. 1–4. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.24.20835
29. MacGregor R.R. *Corynebacterium diphtheria* (Diphtheria). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Philadelphia: Elsevier*, 2014, pp. 2366–2372.
30. Morais S., Costa A.R., Ferro A., Lunet N., Peleteiro B. Contemporary migration patterns in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter*, 2017, vol. 22, iss. 3:e12372. doi: 10.1111/hel.12372
31. Mossong J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., Siennicka J., Trzcinska A., Van Damme P., Beutels P., Vyse A., Shkedy Z., Aerts M., Massari M., Gabutti G. Parvovirus B19 infection in the European countries: seroepidemiology, force of infection, and maternal risk of infection. *Epidemiol. Infect.*, 2008, vol. 136, no. 8, pp. 1059–1068.
32. Nelson T.G., Mitchell C.D., Sega-Hall G.M., Porter R.J. Cutaneous ulcers in a returning traveller: a rare case of imported diphtheria in the UK. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2016, vol. 41, iss. 1, pp. 57–59.
33. Nihal A. Global and South-East Asia regional burden of diphtheria disease and strategies for control. WHO SEARO, 2016. URL: <http://www.searo.who.int/mediacentre/releases/2016/en/> (06.03.2018)
34. Rousseau C.B., Broche B., Badell E., Guiso N., Laharie I., Patey O., Levi-Bruhl D. Diphtheria in the south of France. *Eurosurveillance*, 2011, vol. 16, iss. 19, pp. 1–3. doi: 10.2807/ese.16.19.19867-en
35. Sane G., Sorvari T., Widerstrom M., Kauma H., Kaukonen U., Tarkka E., Puumalainen T., Kuusi M., Salminen M., Lyytikäinen O. Respiratory diphtheria in an asylum seeker from Afghanistan arriving to Finland via Sweden. *Eurosurveillance*, 2015, vol. 21, no. 24, pp. 14–17. doi: 10.2807/1560-7917.

36. Tissot-Dupont H., Raoult D., Brougui P. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am. J. Med.*, 1992, vol. 93, pp. 427–434.
37. Ueda J., Goshu M., Inui Y., Matsuda T., Sakakibara M., Mabe K., Nakajima S., Shimoyama T., Yasuda M., Kawai T., Murakami K., Kamada T., Mizuno M., Kikuchi S., Lin Y., Kato M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection by birth year and geographic area in Japan. *Helicobacter*, 2014, vol. 19, iss. 2, pp. 105–110. doi: 10.1111/hel.12110

Авторы:

Краева Л.А., д.м.н., доцент, зав. лабораторией медицинской бактериологии, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Рощина Н.Г., к.б.н., зав. лабораторией идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Кафтырева Л.А., д.м.н., зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Кунилова Е.С., младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Курова Н.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Стоянова Н.А., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Антипова А.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Сварваль А.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Зуева Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Порин А.А., к.м.н., доцент, научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

Рогачева Е.В., студентка ФВМ Санкт-Петербургской государственной академии ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Желтакова И.Р., научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Хамитова И.В., зав. Центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Тимофеева Е.В., зам. начальника отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия;

Беспалова Г.И., к.б.н., доцент кафедры микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Microbiology, Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation;

Tokarevich N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Lavrentyeva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Roshchina N.G., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Identification of Pathogenes, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Kunilova E.S., Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Kurova N.N., Senior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Stoyanova N.A., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Antipova A.Y., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Svarval A.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Identification of Pathogenes, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Porin A.A., Researcher, Laboratory of Intestinal Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

Rogacheva E.V., Student of the St. Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Zheltakova I.R., Researcher, Laboratory of Identification of Pathogenes, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Khamitova I.V., Head of Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Timofeeva E.V., Deputy Chief of Department of Epidemiological Supervision of The Office of the Federal Service For Supervision of Consumer Rights Protection And Human Wellbeing in Saint Petersburg, St. Petersburg, Russian Federation;

Bespalova G.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ (pre-S1/pre-S2/S)

Е.В. Эсауленко¹, А.А. Сухорук¹, К.А. Захаров¹, А.А. Яковлев²

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² СПбГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В настоящее время широко используются вакцины против гепатита В второго поколения, получаемые в биотехнологических эукариотических системах на основе дрожжей и содержащие S-белковый домен частицы HBsAg при полном отсутствии доменов pre-S1 и pre-S2. Вместе с тем доказано, что именно эти антигены могут значительно влиять на иммуногенность, что делает разработку и использование вакцин третьего поколения, содержащих все антигенные детерминанты, перспективной задачей. Для сравнительного изучения иммуногенности вакцин второго и третьего поколений Engerix-B™ и Sci-B-Vac™ было проведено рандомизированное двойное слепое клиническое исследование. В исследование были включены здоровые лица обоих полов в возрасте от 18 до 45 лет (n = 94), серонегативные в отношении HBsAg, HBsAb, HBcAb при скрининге и ранее не получавшие иммунобиологические средства профилактики гепатита В. В группу I (n = 47) вошли лица, получившие вакцину второго поколения Engerix-B™, в группу II (n = 47) — вакцину третьего поколения Sci-B-Vac™. Вакцинация осуществлялась трехкратно — в 1, 28 и 180 дни исследования. Концентрация HBsAb, показатели сероконверсии (доля лиц с концентрацией HBsAb > 2,1 мМЕ/мл) и серопротекции (доля лиц с концентрацией HBsAb ≥ 10 мМЕ/мл) оценивались на 28, 90, 180 и 210 день исследования. При оценке показателя ранней сероконверсии на 28 день исследования установлено, что он составил 76,60% в группе I и 93,88% в группе II (p < 0,05); показатель серопротекции составил 51,06 и 61,22% соответственно. Данные различия в отношении доли лиц, достигших сероконверсии на 28 день исследования, могут свидетельствовать о наступлении более быстрого иммунологического ответа на введение вакцины Sci-B-Vac™. При анализе средних значений концентрации HBsAb в группах I и II были получены данные о наличии статистически значимых различий между уровнем антител на 90 и 180 день исследования (p < 0,05). На 90 день исследования в группе I концентрация HBsAb составила 378,68±60,95 мМЕ/мл, в группе II — 618,31±58,34 мМЕ/мл. На 180 день исследования в группе I концентрация HBsAb достигла 441,34±63,83 мМЕ/мл, в группе II — 757,72±55,14 мМЕ/мл. Проведенный анализ значимости зависимости уровня антител от пола, возраста и массы тела выявил, что возраст вакцинированного влияет на концентрацию антител после вакцинации Engerix-B™ (p < 0,05). Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о наличии быстрого и сильного иммунного ответа на введение вакцины третьего поколения Sci-B-Vac™, что может свидетельствовать о преимуществе вакцины, содержащей все три рекомбинантных белка оболочки вируса гепатита В, что, в свою очередь, может сыграть решающую роль в клинической практике при экстренной профилактике гепатита В, а также при использовании у пациентов с иммунокомпроментированными состояниями.

Ключевые слова: вакцина, гепатит В, Sci-B-Vac™, иммуногенность, сероконверсия, серопротекция, pre-S1/pre-S2/S.

Адрес для переписки:

Эсауленко Елена Владимировна
194100, Россия, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2,
Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет.
Тел.: 8 (812) 274-90-65.
E-mail: infection-gpmu@mail.ru

Contacts:

Elena V. Esaulenko
194100, Russia, St. Petersburg, Litovskaya str., 2,
St. Petersburg State Pediatric Medical University.
Phone: +7 (812) 274-90-65.
E-mail: infection-gpmu@mail.ru

Библиографическое описание:

Эсауленко Е.В., Сухорук А.А., Захаров К.А., Яковлев А.А.
Иммуногенность вакцины против гепатита В третьего поколения
(pre-S1/pre-S2/S) // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 71–78.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-71-78

Citation:

Esaulenko E.V., Sukhoruk A.A., Zakharov K.A., Yakovlev A.A. Immunogenicity
of the third generation hepatitis B vaccine (pre-S1/pre-S2/S) // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1,
pp. 71–78. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-71-78

IMMUNOGENICITY OF THE THIRD GENERATION HEPATITIS B VACCINE (pre-S1/pre-S2/S)Esaulenko E.V.^a, Sukhoruk A.A.^a, Zakharov K.A.^a, Yakovlev A.A.^b^a St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation^b Clinical Infection Hospital named after S.P. Botkin, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Currently, second-generation hepatitis B vaccines are widely used. They are produced in biotechnological eukaryotic yeast-based systems and contain the S-protein domain of HBsAg particle in the complete absence of pre-S1 and pre-S2 domains. At the same time, these antigens were proved to significantly influence immunogenicity, which makes the development and use of third-generation vaccines containing all antigenic determinants a long-range objective. A randomized, double-blind clinical study was conducted to compare immunogenicity of second- and third-generation vaccines Engerix-B™ and Sci-B-Vac™, respectively. Healthy subjects of both sexes aged 18 to 45 years (n = 94) who are seronegative for HBsAg, HBsAb, HBcAb at screening and who previously had not received immunobiological agents for hepatitis B prophylaxis were included in the study. Group I (n = 47) received the second-generation vaccine Engerix-B™, Group II (n = 47) — the third-generation vaccine Sci-B-Vac™. Subjects received vaccines three times — on days 1, 28 and 180 of the study. HBsAb levels, rates of seroconversion (the proportion of subjects with HBsAb levels > 2.1 mIU/mL) and seroprotection (the proportion of subjects with HBsAb levels ≥ 10 mIU/mL) were assessed on days 28, 90, 180 and 210 of the study. Early seroconversion rate assessed on Day 28 was 76.60% in Group I and 93.88% in Group II (p < 0.05); seroprotection rate was 51.06 and 61.22%, respectively. These differences in the proportion of subjects who achieved seroconversion on Day 28 may indicate a faster immunological response to Sci-B-Vac™ vaccine. Statistically significant differences between the level of antibodies on days 90 and 180 (p < 0.05) were observed when analyzing the average values of HBsAb concentration in Groups I and II. The concentration of HBsAb on Day 90 was 378.68±60.95 mIU/mL in Group I, and 618.31±58.34 mIU/mL in Group II. On Day 180, the concentration of HBsAb reached 441.34±63.83 mIU/mL in Group I, and 757.72±55.14 mIU/mL in Group II. The significance of dependence of antibody level on sex, age and body weight was analyzed. It was revealed that the age of a vaccinated subject affects antibody level after administration of Engerix-B™ (p < 0.05). The results obtained suggest that there is a rapid and strong immune response to the third-generation vaccine Sci-B-Vac™. This may indicate advantage of the vaccine containing all three recombinant proteins of hepatitis B virus envelope, which, in turn, can play a key role in clinical practice for urgent prophylaxis of hepatitis B, as well as for treatment of immunocompromised conditions.

Key words: hepatitis B, vaccine, Sci-B-Vac™, immunogenicity, seroconversion, seroprotection, pre-S1/pre-S2/S.

Введение

В настоящее время доказано, что именно вакцинация является основным и наиболее надежным способом защиты населения от инфицирования вирусом гепатита В (ВГВ, HBV). Обобщив многолетний опыт применения вакцин против ВГВ, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендовала в качестве наиболее эффективной меры специфической профилактики HBV-инфекции введение вакцинации в национальные календари профилактических прививок вне зависимости от уровня заболеваемости [13].

В Национальный календарь профилактических прививок Российской Федерации (РФ), вакцинация против гепатита В (ГВ) внесена в 2001 г. [4]. Долгосрочный анализ заболеваемости острым ГВ на территории РФ в период 2001–2016 гг. выявил многократное снижение ее уровня. В Северо-Западном федеральном округе заболеваемость составила менее 1 случая на 100 тыс. населения, что соответствует показателю элиминации [1]. Таким образом, ГВ можно отнести к управляемым и контролируемым инфекциям.

Эра разработки вакцин против ГВ началась в конце 70-х гг. прошлого века, когда из плазмы больных ГВ была получена и исследована вакцина, содержащая инактивированные вирусные частицы — вакцина первого поколения [28]. Уже в 1981 г. она была одобрена для использования в системе здравоохранения некоторых стран [29].

Однако в связи с успешными экспериментами по разработке эукариотических клеточных линий, экспрессирующих белок поверхностного антигена ВГВ (HBsAg), ей на смену пришли вакцины второго поколения. Первая рекомбинантная вакцина против ГВ, получившая коммерческое название Engerix-B™, была разработана и внедрена в клиническую практику в 1986 г. [9]. В настоящее время разработано семь вакцин второго поколения, широко используемых как в мире, так и в РФ [2, 31].

Активной субстанцией рекомбинантной вакцины является HBsAg, который получают на дрожжевых клетках или клетках животного происхождения, в которые с помощью плазмид вводится ген HBsAg [9]. Данные вакцины индуцируют образование специфических антител к HBsAg (HBsAb), концентрация которых, рав-

ная 10 мМЕ/мл, достаточна для создания иммунитета против ВГВ [24]. В настоящее время имеются доказательства, свидетельствующие, что достижение защитной концентрации антител после первичной иммунизации приводит к формированию долговременной иммунологической памяти и обеспечивает продолжительную защиту от ГВ даже при дальнейшем падении концентрации антител [30].

Иммуногенность вакцины Enderix-B™ неоднократно изучалась у лиц различных возрастных групп (взрослых, детей и новорожденных). Многочисленные исследования, проведенные в РФ и за рубежом, показали, что через 1 месяц после введения первой дозы вакцины частота выявления антител составила 13–20%, через месяц после введения второй дозы — 53–67%, а через месяц после третьей дозы — 93–100% [3]. Вакцины против ГВ второго поколения являются эффективными и широко используются в различных странах.

Несмотря на то, что именно с развитием генно-инженерных технологий и широким внедрением в практику вакцин второго поколения, появилась возможность контроля HBV-инфекции, они оказались не лишены ряда недостатков. Рекомбинантные вакцины второго поколения не содержат в своем составе доменов pre-S1 и pre-S2, которые существенным образом влияют на их иммуногенность и протективные свойства [10, 20]. Кроме того, они не запускают каскад иммунологических реакций, приводящих к образованию антител к pre-S1 и pre-S2 антигенам, играющих важную защитную роль [15, 18, 19, 21]. В дополнение к гуморальному ответу, для появления защитного иммунитета требуется также эффективный клеточный ответ со стороны клеток памяти, антигенпрезентирующих клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов. Известно, что домены pre-S1 и pre-S2 содержат антигенные детерминанты, специфичные к Т-лимфоцитам, что также играет существенную роль в формировании протективных эффектов вакцины [18, 20].

Все вышеперечисленное явилось предпосылкой к дальнейшему проведению исследований и разработке вакцины третьего поколения, получившей название Sci-B-Vac™ и содержащей все три рекомбинантных белка оболочки ВГВ — малый антиген S (HBsAg), средний pre-S2 и большой pre-S1 поверхностные антигены.

Следует отметить, что в ходе разработки вакцины Sci-B-Vac™, ее повышенная иммуногенность была доказана в ряде контролируемых сравнительных исследований, проведенных с участием детей и взрослых, а также в особых группах пациентов (пациенты с им-

муносупрессией, страдающие почечной недостаточностью, а также лица, не отвечающие на вакцины второго поколения) [7, 8, 12, 22, 23, 26, 27, 32, 33, 34, 35], что отражает ее особое значение при использовании у иммунокомпрометированных лиц, а также при необходимости осуществления мер экстренной профилактики ГВ [16, 25].

Несмотря на широкое изучение эффективности вакцин второго и третьего поколений, ранее не выполнялись исследования, в которых проводилась сравнительная оценка иммуногенности после их однократного или двукратного введения для оценки скорости нарастания иммунного ответа.

Цель исследования — сравнительный анализ эффективности и иммуногенности вакцин второго и третьего поколений (Enderix-B™ и Sci-B-Vac™) у взрослых добровольцев, ранее не получавших иммунобиологических средств профилактики ГВ.

Материалы и методы

Исследование проведено в 2013 г. в 3 исследовательских центрах, открытых на территории РФ на основании разрешения Министерства здравоохранения РФ. Все этапы исследования соответствовали законодательству РФ, требованиям Надлежащей клинической практики, международным этическим нормам, а также одобрены локальными независимыми комитетами по этике.

Клиническое исследование являлось сравнительным рандомизированным двойным слепым по оценке эффективности вакцин Sci-B-Vac™ и Enderix-B™ в двух параллельных группах.

В исследование было включено 100 здоровых добровольцев старше 18 лет, ранее не получавших иммунобиологических профилактических средств против ГВ.

Добровольцы, прошедшие скрининг и соответствующие критериям включения, были случайно распределены (рандомизированы) в две группы в соотношении 1:1, для введения вакцины Sci-B-Vac™ (группа I) или Enderix-B™ (группа II).

Вакцинация проводилась в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.1.2341-08 «Профилактика вирусного гепатита В» [5], внутримышечно в дельтовидную область по принятому графику трехкратно: 1 доза — момент начала вакцинации, 2 доза — через 28 дней после 1 прививки, 3 доза — через 180 дней от начала иммунизации (0–28–180). Разовая доза HBsAg составляла 20 мкг для Enderix-B™ и 10 мкг для Sci-B-Vac™, что соответствовало инструкциям по медицинскому применению этих препаратов.

Для оценки эффективности вакцинации были использованы критерии Европейской фармакопеи [11] и Рекомендаций ВОЗ по оценке качества, безопасности и эффективности рекомбинантных вакцин против ГВ [31]:

- показатель сероконверсии — доля лиц, приобретших антитела к HBsAg в концентрации 2,1 мМЕ/мл и более в результате иммунизации;
- показатель серопротекции — доля лиц, у которых определялись HBsAb в концентрации более 10 мМЕ/мл.

Вакцина считается эффективной при достижении уровня сероконверсии в 95% случаев и более [11, 31].

Определение концентрации HBsAb выполняли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производства фирмы Abbott Laboratories (США).

Иммунологические показатели, а именно: концентрация HBsAb, показатели сероконверсии и серопротекции оценивались на 28, 90, 180 и 210 дни исследования. Забор крови для оценки указанных показателей проводился до введения вакцины. Такая схема мониторинга позволила проанализировать данные показатели после одно-, двух- и трехкратного применения исследуемых вакцин и оценить силу и скорость иммунологического ответа, которая выражалась в оценке показателей сероконверсии и серопротекции после второй и третьей вакцинации, а также оценке концентрации HBsAb в каждой из исследуемых групп.

Статистический анализ включал в себя следующие критерии и методы:

- В качестве первичного конечного показателя эффективности вакцин было выбрано

значение показателя сероконверсии после третьей вакцинации. Для его оценки была выбрана гипотеза «не хуже». Данная гипотеза принималась, если рассчитанный доверительный интервал для разности долей (по показателям сероконверсии в группах) содержал ноль, а нижняя граница доверительно интервала была не ниже — 4%.

– Доля лиц с сероконверсией и серопротекцией на 28, 90, 180 и 210 день исследования анализировались с использованием χ^2 для долей. Статистически значимыми считали различия при достигнутом $p < 0,05$.

– Концентрация HBsAb представлена в виде средней величины и стандартной ошибки среднего.

– Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA применялся при сравнении концентрации антител в зависимости от пола, возраста, массы тела и вводимой вакцины. Для оценки возможных различий, выявленных после проведенного дисперсионного анализа, выполнялись попарные сравнения средних значений имеющихся групп с помощью метода Тьюки. Статистически значимыми считали различия при достигнутом $p < 0,05$.

Результаты

Всего в исследование было включено, случайно распределено по группам и вакцинировано в первый день 100 человек. Сравнительная демографическая характеристика лиц, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Согласно проанализированным демографическим данным, ни по одному из параметров не было выявлено статистически значимых

Таблица 1. Демографическая характеристика лиц, включенных в исследование

Table 1. Demography data of included subjects

Параметр Variable	Группа I Group I	Группа II Group II	p
Число добровольцев, абс. Number of subjects, abs.	50	50	> 0,05
Гендерный состав, абс. Sex, abs.	Мужчины Men	21	> 0,05
	Женщины Women	29	> 0,05
Средний возраст, лет (M±SD) Average age, years (M±SD)	28,38±7,72	30,56±8,13	> 0,05
Средний рост, см (M±SD) Average height, cm (M±SD)	170,24±9,56	173,10±9,20	> 0,05
Средний вес, кг (M±SD) Average weight, kg (M±SD)	70,11±12,20	71,49±15,91	> 0,05
Средний индекс массы тела, кг/м ² (M±SD) Average body mass index, kg/m ² (M±SD)	24,18±3,71	23,64±3,69	> 0,05
Европеоидная раса Caucasian race	+	+	-

Таблица 2. Показатели сероконверсии и серопротекции в различные сроки исследования

Table 2. Seroconversion and seroprotection rates in different timepoints of study

День исследования Day of study	Показатель сероконверсии, % Seroconversion rate, %			Показатель серопротекции, % Seroprotection rate, %		
	Группа I Group I	Группа II Group II	р	Группа I Group I	Группа II Group II	р
День 1 Day 1	0	0	–	0	0	–
День 28 Day 28	93,88	76,60	< 0,05	61,22	51,06	> 0,05
День 90 Day 90	100,00	95,75	> 0,05	95,92	87,23	> 0,05
День 180 Day 180	100,00	95,75	> 0,05	100,00	89,36	> 0,05
День 210 Day 210	100,00	97,87	> 0,05	100,00	97,87	> 0,05

различий между группами, что свидетельствует о равномерном распределении добровольцев между ними и успешной рандомизации.

В ходе проведения исследования на его различных этапах шесть человек отказались от дальнейшего участия и были исключены из исследования.

При оценке показателя сероконверсии после полного курса вакцинации было установлено, что на 210 день исследования в группе I он достиг 100%, а в группе II — 97,87%. Вычисленный 95% доверительный интервал содержал 0 (–2,02; 6,28%), а его нижний предел был выше заявленной величины в –4%, поэтому можно утверждать, что гипотеза «не хуже» подтвердилась и иммуногенность вакцины Sci-B-Vac™ как минимум не хуже таковой для вакцины Engerix-B™.

Сводные данные о достигнутых показателях сероконверсии и серопротекции представлены в таблице 2.

Оценка показателя сероконверсии на 28, 90, 180 и 210 день исследования по сравнению с 1 днем с использованием критерия Мак-Немара продемонстрировала, что более 95% добровольцев достигли сероконверсии уже после двух вакцинаций, что даже превосходит требования, предъявляемые ВОЗ относительно эффективности рекомбинантных профилактических вакцин против ГВ, и свидетельствует о высокой иммуногенности использованных вакцин.

Обращают на себя внимание существенные различия в показателях сероконверсии в исследуемых группах после первой вакцинации. На 28 день исследования сероконверсия наблюдалась у 93,88% лиц в группе I и у 76,60% лиц группы II ($p < 0,05$).

Статистический анализ доли лиц, достигших серопротекции, продемонстрировал, что на 28, 90, 180 и 210 день исследования оба исследуемых препарата обеспечивают сопоставимый

уровень защиты против инфицирования ВГВ ($p > 0,05$), статистически значимого превосходства вакцины Sci-B-Vac™ показано не было.

Динамика изменения средних геометрических значений концентрации HBsAb представлена на рисунке.

Установлено, что концентрация антител была выше в группе добровольцев, вакцинированных Sci-B-Vac™. Для лиц, вакцинированных препаратом Sci-B-Vac™, на 90 день вакцинации концентрация HBsAb составила $618,31 \pm 58,34$ мМЕ/мл, на 180 день — $757,72 \pm 55,14$ мМЕ/мл и $891,36 \pm 37,01$ мМЕ/мл на 210 день исследования. Для лиц, вакцинированных Engerix-B™, на 90 день вакцинации концентрация HBsAb составила $378,68 \pm 60,95$ мМЕ/мл, на 180 день — $441,34 \pm 63,83$ мМЕ/мл и $787,04 \pm 51,33$ мМЕ/мл на заключительном визите.

Статистический анализ средних геометрических значений концентраций антител проводился с использованием дисперсионного анализа ANOVA и критерия Тьюки. Установлено наличие статистически значимых различий между уровнем антител на 90 и 180 день исследования в группах добровольцев.

Проведенный анализ значимости зависимости уровня антител от пола, возраста и массы тела выявил, что возраст вакцинированного влияет на концентрацию антител после вакцинации Engerix-B™ ($p < 0,05$). В то же время, после использования вакцины Sci-B-Vac™ такая зависимость не наблюдалась ($p > 0,05$). В обеих группах не получено данных о влиянии массы тела и пола на концентрацию защитных антител ($p > 0,05$).

Обсуждение

Полученные нами данные показателей сероконверсии на 28, 90, 180 и 210 день исследования отличаются от результатов оценки эффектив-

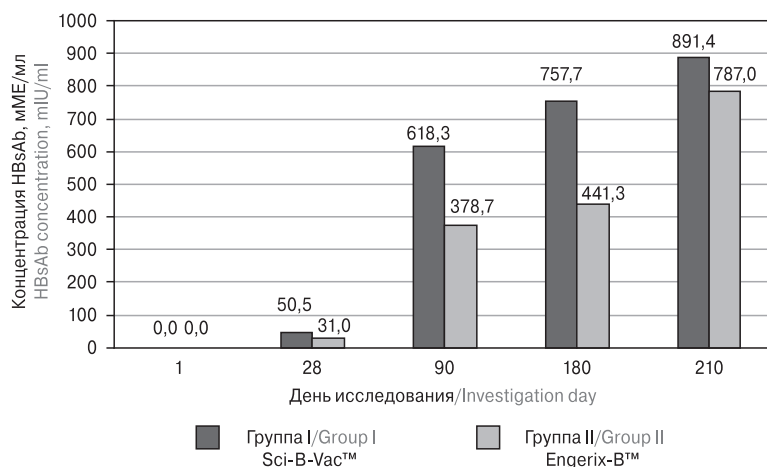


Рисунок. Динамика изменения средних геометрических значений концентрации HBsAb

Figure. Dynamics of HBsAb concentration geometric mean values changes

ности рекомбинантных вакцин второго поколения, полученных в более ранних исследованиях [14]. С другой стороны, исследования, проведенные в конце 90-х — начале 2000-х гг. продемонстрировали сходные с нами результаты [6, 17]. Это может быть объяснено, как и в нашем случае, участием в этих исследованиях относительно молодых и здоровых субъектов, лучше отвечающих на проводимую вакцинацию. Возможно, существенно больший показатель сероконверсии на 28 день исследования в группе субъектов, получавших Sci-B-Vac™, может свидетельствовать о наступлении более быстрого иммунологического ответа на введение этой вакцины. Сведений об уровне показателя сероконверсии через месяц после однократного применения вакцин второго и тем более третьего поколений в доступных литературных источниках обнаружить не удалось.

В отношении показателя серопротекции, оба исследуемых препарата обеспечивают сопоставимый уровень защиты, при этом причины относительно сильного ответа в ранние

периоды могут быть аналогичными и связанными с выбранной исследуемой популяцией. Обращает на себя внимание тот факт, что, несмотря на большую долю добровольцев, достигших серопротекции на день 28 в группе I, статистически значимого превосходства вакцины Sci-B-Vac™ показано не было.

В заключении следует отметить, что в ходе исследования обе вакцины продемонстрировали достаточную эффективность с точки зрения достижения необходимого уровня сероконверсии и серопротекции.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о наличии быстрого и сильного иммунного ответа на введение вакцины Sci-B-Vac™, превосходящего таковой для вакцины Engerix-B™, что может свидетельствовать о преимуществе вакцин, содержащих все три антигенные детерминанты оболочки ВГВ. Это может сыграть решающую роль в клинической практике, например, при экстренной профилактике ГВ или при использовании у иммунокомпроментированных пациентов.

Список литературы/References

1. Вирусные гепатиты в Российской Федерации. Аналитический обзор. 10 выпуск. Под ред. В.И. Покровского, А.А. Тотолыана. СПб: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2016. 152 с. [Virusnye gepatity v Rossiiskoi Federatsii. Analiticheskii obzor. 10 vypusk. Pod red. V.I. Pokrovskogo, A.A. Totolyana [Viral hepatitis in the Russian Federation. Analytical review. 10th edition. Eds. V.I. Pokrovskii, A.A. Totolian]. St. Petersburg: St. Petersburg Pasteur Institute, 2016. 152 p.]
2. Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx> (19.02.2018)
3. Елагин Р.И. Итоги и перспективы использования вакцины «Энджерикс В» для профилактики инфекции вирусом гепатита В // Consilium Medicum. 2001. № 8. [Elagin R.I. Summary and perspective of using of vaccine “Engerix B” for hepatitis B infection prevention. *Consilium Medicum*, 2001, no. 8. (In Russ.)]
4. О национальном календаре профилактических прививок и календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 229 от 27.06.2001 г. URL: <http://www.infectology.ru/forall/priczaz3.aspx> (19.02.2018)
5. Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.1.2341-08. Профилактика вирусного гепатита В: постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 14 от 28.02.2008 г. Российская газета, 2008, № 4631 (0). URL: <https://rg.ru/2008/04/05/gepatit-pravila-dok.html> (19.02.2018)

6. Cassidy W.M., Watson B., Ioli V.A., Williams K., Bird S., West D.J. A randomized trial of alternative two- and three-dose hepatitis B vaccination regimens in adolescents: antibody responses, safety, and immunologic memory. *Pediatrics*, 2001, vol. 107, no. 4, pp. 626–631.
7. Diminsky D., Moav N., Gorecki M., Barenholz Y. Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. *Vaccine*, 1999, vol. 18, no. 1–2, pp. 3–17.
8. Diminsky D., Schirmbeck R., Reimann J., Barenholz Y. Comparison between HBsAg particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. *Vaccine*, 1997, vol. 15, no. 6–7, pp. 637–647.
9. Hauser P., Voet P., Simoen E., Thomas H.C., Pêtre J., De Wilde M., Stephenne J. Immunological properties of recombinant HBsAg produced in yeast. *Postgrad. Med. J.*, 1987, vol. 63, suppl. 2, pp. 83–91.
10. Heerman K.H., Goldmann U., Schwartz W., Seyffarth T., Baumgarten H., Gerlich W.H. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J. Virol.*, 1984, vol. 52, no. 2, pp. 396–402.
11. Hepatitis B vaccine (rDNA). European Pharmacopoeia 7.0, 01/2008:1056. URL: <http://www.fpl.ru/biblioteka/farmacop/EP-7.0-2.pdf> (19.02.2018)
12. Hourvitz A., Mosseri R., Solomon A., Yehezkeli Y., Atsmon J., Danon Y.L., Koren R., Shouval D. Reactogenicity and immunogenicity of a new recombinant hepatitis B vaccine containing Pre S antigens: a preliminary report. *J. Viral. Hepat.*, 1996, vol. 3, no. 1, pp. 37–42.
13. Immunisation policy. Global programme for vaccines and immunization. Expanded programme on immunization. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1995, 63 p. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63114/1/WHO_EPI_GEN_95.03_Rev.1.pdf (19.02.2018)
14. Karpuch J., Scapa E., Eshchar J., Waron M., Bar-Shany S., Shwartz T. Vaccination against hepatitis B in a general hospital in Israel: antibody level before vaccination and immunogenicity of vaccine. *Isr. J. Med. Sci.*, 1993, vol. 29, no. 8, pp. 449–452.
15. Klinkert M.Q., Theilmann L., Pfaff E., Schaller H. Pre-S1 antigens and antibodies early in the course of acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.*, 1986, vol. 58, no. 2, pp. 522–525.
16. London W.T., Drew J.S., Lustbader E.D., Werner B.G., Blumberg B.S. Host responses to hepatitis B infection in patients in a chronic hemodialysis unit. *Kidney Int.*, 1977, vol. 12, iss. 1, pp. 51–58. doi: 10.1038/ki.1977.78
17. Marsano L.S., West D.J., Chan I., Hesley T.M., Cox J., Hackworth V., Greenberg R.N. A two-dose hepatitis B vaccine regimen: proof of priming and memory responses in young adults. *Vaccine*, 1998, vol. 16, no. 6, pp. 624–629.
18. Michel M.L., Pontisso P., Sobczak E., Malpièce Y., Streeck R.E., Tiollais P. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, no. 24, pp. 7708–7712.
19. Milich D.R., Thornton G.B., Neurath A.R., Kent S.B., Michel M.L., Tiollais P., Chisari F.V. Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science*, 1985, vol. 228, no. 4704, pp. 1195–1199.
20. Neurath A.R., Kent S.B.H. The pre-S region of hepadnavirus envelope proteins. *Adv. Virus. Res.*, 1988, vol. 34, pp. 65–142. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60516-3
21. Petit M.A., Maillard P., Capel F., Pillot J. Immunochemical structure of the hepatitis B surface antigen vaccine-II. Analysis of antibody responses in human sera against the envelope proteins. *Mol. Immunol.*, 1986, vol. 23, no. 5, pp. 511–523.
22. Raz R., Dagan R., Gallil A., Brill G., Kassis I., Koren R. Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in children. *Vaccine*, 1996, vol. 14, no. 3, pp. 207–211.
23. Raz R., Koren R., Bass D. Safety and immunogenicity of a new mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in adults. *Isr. Med. Assoc. J.*, 2001, vol. 3, no. 5, pp. 328–332.
24. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of recombinant hepatitis B vaccines. Adopted by the 61st meeting of the WHO Expert Committee on Biological Standardization, 18 to 22 October 2010. URL: http://www.who.int/biologicals/HEP_B_Recomm_after_ECBS_endorsment_final.pdf (19.02.2018)
25. Ribot S. Duration of hepatitis B surface antigenemia (HBsAg) in hemodialysis patients. *Arch. Intern. Med.*, 1979, vol. 139, no. 2, pp. 178–180.
26. Shapira M.Y., Zeira E., Adler R., Shouval D. Rapid seroprotection against hepatitis B following the first dose of Pre-S1/Pre-S2/S vaccine. *J. Hepatol.*, 2001, vol. 34, no. 1, pp. 123–127.
27. Shouval D., Ilan Y., Hourvitz A., Mosseri R., Solomon A., Zychowicz C., Gornicki J., Czubkowska I., Madalinski K., Burczynska B., Adler R., Gorecki M., Koren R. Immunogenicity of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing pre S2 and Pre S1 antigens: a preliminary report. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Eds. Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T. Tokyo: Springer Verlag, 1993, 543–546. doi: 10.1007/978-4-431-68255-4_142
28. Szmuness W., Stevens C.E., Harley E.J., Zang E.A., Oleszko W.R., William D.C., Sadovsky R., Morrison J.M., Kellner A. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 1980, vol. 303, no. 15, pp. 833–841.
29. Szmuness W., Stevens C.E., Zang E.A., Harley E.J., Kellner A. A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report. *Hepatology*, 1981, vol. 1, no. 5, pp. 377–385.
30. Van Damme P., Van Herck K. A review of the long-term protection after hepatitis A and B vaccination. *Trav. Med. Infect. Dis.*, 2007, vol. 5, no. 2, pp. 79–84. doi: 10.1016/j.tmaid.2006.04.004
31. World Health Organization. Prequalified Vaccines. Geneva, Switzerland. URL: https://extranet.who.int/gavi/PQ_Web/ (19.02.2018)
32. Yap I., Guan R., Chan S.H. Comparison of immunogenicity of a pre-S containing HBV vaccine with non-pre-S containing vaccines (Abstract 272). *Viral hepatitis and liver disease: proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (8th Triennial Congress)*. Eds. Nishioka K., Suzuki H., Mishiro S., Oda T. Tokyo: Springer Verlag, 1993, p. 86.
33. Yap I., Guan R., Chan S.H. Recombinant DNA hepatitis B vaccine containing Pre-S components of the HBV coat protein—a preliminary study on immunogenicity. *Vaccine*, 1992, vol. 10, no 7, pp. 439–432.

34. Yap I., Guan R., Chan S.H. Study on the comparative immunogenicity of a recombinant DNA hepatitis B vaccine containing pre-S components of the HBV coat protein with non pre-S containing vaccines. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1995, vol. 10, iss. 1, pp. 51–55. doi: 10.1111/j.1440-1746.1995.tb01047.x
35. Yerushalmi B., Raz R., Blondheim O., Shumov E., Koren R., Dagan R. Safety and immunogenicity of a novel mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine containing Pre-S1 and Pre-S2 antigens in neonates. *Pediatr. Infect. Dis.*, 1997, vol. 16, no. 6, pp. 587–592.

Авторы:

Эсауленко Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Сухорук А.А., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Захаров К.А., аспирант кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Яковлев А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия; главный врач ГБУЗ Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Esaulenko E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Adult Infection Diseases and Epidemiology Department of St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Sukhoruk A.A., PhD (Medicine), Professor Assistant of Adult Infection Diseases and Epidemiology Department of St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Zakharov K.A., Postgraduate Student at Adult Infection Diseases and Epidemiology Department of St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Yakovlev A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Infection Diseases, Epidemiology, Dermatology and Venerology Department of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation; Chief Physician at Clinical Infection Hospital named after S.P. Botkin, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 07.11.2017
Отправлена на доработку 23.01.2018
Принята к печати 13.03.2018

Received 07.11.2017
Revision received 23.01.2018
Accepted 13.03.2018

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ

Н.С. Козлова¹, Н.Е. Баранцевич², Е.П. Баранцевич²

¹ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В статье представлены результаты оценки чувствительности к 16 антимикробным препаратам 421 штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в 2015 г. из различного материала пациентов многопрофильного стационара с нозокомиальными гнойно-септическими инфекциями. Большая часть штаммов была нечувствительна к комбинациям ампициллин/клавуланат (91,4%), тикарциллин/клавуланат (81,9%) и пиперациллин/тазобактам (69,4%), а также к фторхинолонам (83,6%), цефалоспорином III и IV поколения (79,8%) и гентамицину (72,9%), треть культур (34,2%) проявляла нечувствительность к амикацину. Выявлен высокий удельный вес штаммов *K. pneumoniae*, нечувствительных к карбапенемам (53,0% — к эртапенему, 42,8% — к меропенему и 37,1% — к имипенему), а также культур с ассоциированной резистентностью к АМП разных групп — цефалоспорином, аминогликозидам и фторхинолонам, который составил более половины от общего числа штаммов (57,7%), включая 44,2% культур, устойчивых еще и к карбапенемам. Наибольшую активность в отношении *K. pneumoniae* проявляли фосфомицин (8,5% устойчивых культур) и тигециклин, при этом все нечувствительные к последнему штаммы (7,4%) относились к категории микроорганизмов с промежуточной устойчивостью, минимальная подавляющая концентрация тигециклина составила для них 2 мкг/мл. Выявлено большое разнообразие спектров антибиотикорезистентности *K. pneumoniae* с высоким удельным весом штаммов с фенотипом множественной устойчивости (87,2%). Резистентность к карбапенемам у клебсиелл в многопрофильном стационаре была детерминирована либо геном *bla*_{OXA-48} (59,3% устойчивых к карбапенемам изолятов), либо геном *bla*_{NDM-1} (40,7% резистентных к карбапенемам клебсиелл).

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антимикробные препараты, антибиотикорезистентность, карбапенемазы, многопрофильный стационар, нозокомиальные инфекции.

SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED IN A MULTIDISCIPLINARY MEDICAL CENTRE

Kozlova N.S.^a, Barantsevich N.E.^b, Barantsevich E.P.^b

^a North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

^b Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Susceptibility to 16 antimicrobial agents in 421 *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated in a multidisciplinary medical centre from patients with nosocomial infections in 2015, was tested. The majority of studied strains were resistant to antibiotics: ampicillin/clavulanic acid (91.4%), ticarcillin/clavulanic acid (81.9%), piperacillin/tazobactam (69.4%), fluorochinolones (83.6%),

Адрес для переписки:

Козлова Надежда Сергеевна
191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41,
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ.
Тел.: 8 (812) 543-19-20 (служебн.).
E-mail: spbkns@gmail.com

Contacts:

Nadezda S. Kozlova
191015, Russian Federation, St. Petersburg, Kirochnaya str., 41,
North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov.
Phone: +7 (812) 543-19-20 (office).
E-mail: spbkns@gmail.com

Библиографическое описание:

Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84

Citation:

Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84

III and IV generation of cephalosporines (79.8%), gentamycin (72.9%); one third (34.2%) demonstrated resistance to amikacin. *K. pneumoniae* strains demonstrated high level of carbapenem resistance (53.0% — to ertapenem, 42.8% — to meropenem and 37.1% — to imipenem), associated resistance to at least 3 different classes of antibiotics — caphalosporins, aminoglycozides, fluorochinolones, that amounted to more than half of the strains (57.7%), including 44.2% of the strains, additionally resistant to carbapenems. The lowest level of resistance was found to fosfomycin (8.5%) and tigecycline (7.4%), resistant cultures showed intermediate resistance with MIC 2 µg/ml to the latter. High diversity of antimicrobial resistance spectra was found, with high level of multidrug resistant strains (87.2%). Resistance to carapenems in *K. pneumoniae* isolated in the multidisciplinary medical center was determined by either *bla*_{OXA-48} (59.3% of isolates, resistant to carbapenems) or *bla*_{NDM-1} (40.7%).

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotics, resistance to antibiotics, carbapenemases, multidisciplinary medical centre, nosocomial infection.

Введение

В последние десятилетия в структуре возбудителей инфекционных заболеваний произошли значительные изменения. Помимо открытия новых инфекционных агентов, в инфекционной патологии значительно увеличилась роль широко известных микроорганизмов, появилось понятие «оппортунистические инфекции», которые возникают на фоне иммунодефицитных состояний и вызываются преимущественно условно-патогенными микробами (УПМ). Развитию таких инфекций способствуют оперативные вмешательства, применение антимикробных препаратов (АМП), особенно широкого спектра действия, используемые в медицинской практике искусственные протезы, сосуды, суставы и др., которые представляют отличную среду для колонизации УПМ и образования ими биопленок [8]. Идеальные для таких микробов условия создаются в медицинских учреждениях, прежде всего стационарах, особенно многопрофильных, что приводит к селекции и распространению нозокомиальных штаммов определенной видовой принадлежности и доминирующих спектров устойчивости к АМП. Такие штаммы приобретают способность не только выживать, но и размножаться в растворах дезинфектантов и антисептиков, не утрачивая при этом гены антибиотикорезистентности [5]. Наиболее актуальными возбудителями внутрибольничных инфекций в большинстве стационаров являются энтеробактерии, преимущественно *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. [2, 4, 6, 9], для которых характерно выраженное разнообразие генов и механизмов резистентности. Плазмидная локализация генов, кодирующих синтез бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) обеспечивает быстрое распространение устойчивости к цефалоспорином как среди патогенных [7], так и условно-патогенных энтеробактерий [2, 5, 6], в результате чего эффективность препаратов этой группы значительно снижается. Так, в 2015 г. в странах Европы среди устойчивых к бета-лактамам антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae* продуценты БЛРС составляли 85,3% [11]. В то же время все чаще выявляются штаммы энтеробактерий, прежде всего *K. pneumoniae*, резистентные еще и к карбапенемам за счет продукции ими карбапенемаз

NDM, КРС, ОХА-48 и VIM типов [1, 10]. Такие культуры часто характеризуются ассоциированной устойчивостью к АМП других групп, составляя в отдельных стационарах до 30% выделенных штаммов [6, 10]. Клебсиеллы чаще всего вызывают инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, прежде всего поражения мочевыделительной системы, респираторного тракта и кровотока [11].

Учитывая высокий уровень резистентности клебсиелл к антимикробным препаратам разного механизма действия и ее выраженную вариабельность в зависимости от региона и даже стационара, очень важным представляется изучение антибиотикорезистентности этих микроорганизмов, особенно циркулирующих в многопрофильных стационарах [9], что и явилось целью нашего исследования.

Материалы и методы

В 2015 г. в многопрофильном стационаре г. Санкт-Петербурга из мочевыделительной системы (моча, мочевые катетеры), респираторного тракта (мокрота, жидкость бронхо-альвеолярного лаважа, катетеры из трахеи, промывные воды бронхов), а также крови и центральных венозных катетеров (ЦВК) больных с нозокомиальными гнойно-септическими инфекциями (ГСИ) был выделен 421 штамм *K. pneumoniae*. Культуры, выделенные из мочевыделительного тракта (МТ), составили 39,2% выделенных культур, из респираторного тракта (РТ) — 32,3%, из крови и катетеров — 28,5%.

Идентификация этиологически значимых микроорганизмов осуществлялась фенотипически и по последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена 16S РНК [4]. Определение чувствительности выделенных чистых культур энтеробактерий к АМП проводилось методом серийных разведений в агаре Мюллера–Хинтон с диапазоном концентраций от 0,06 до 128 мкг/мл [11].

Была определена чувствительность всех штаммов к 16 антибактериальным препаратам: цефотаксиму (Сtx), цефепиму (Срm), цефтазидиму (Сzd), цефтриаксону (Сta), комбинациям амоксициллин/клавуланат (Am/cl), пиперациллин/тазобактам (Pip/tb) и тикарциллин/клавуланат (Tik/cl), ципрофлоксацину (Cip), моксифлоксацину (Mox), имипенему (Im), меропене-

му (Mer), эртапенему (Ert), гентамицину (Gm), амикацину (Ak), фосфомицину (Fm) и тигециклину (Tg). Были использованы референтные штаммы *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218. Определение категорий чувствительности на основании полученных МИК проводили в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013) [12].

Для определения присутствия генов резистентности к карбапенемам в изучаемых штаммах применяли ПЦР с последующим секвенированием продукта амплификации для выявления и типирования генов, кодирующих выработку карбапенемаз, как было описано ранее [1].

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ чувствительности клебсиелл, выделенных в стационаре, к антимикробным препаратам, показал высокий уровень их антибиотикорезистентности. Большая часть изученных культур (92,9%) оказались устойчивы хотя бы к одному антибактериальному препарату, наиболее высоким был удельный вес таких штаммов среди изолятов, выделенных из крови (97,5%), несколько ниже он был в моче (93,3%) и респираторном тракте (88,2%). Ингибитор-защищенные бета-лактамы не обладали высокой активностью в отношении клебсиелл (рис.), большая часть штаммов была нечувствительна к комбинациям ампициллин/клавуланат (91,4%) и тикарциллин/клавуланат (81,9%), несколько меньшим был удельный вес культур, резистентных к комбинации пиперациллин/тазобактам (69,4%). Активность фторхинолонов также была невысока — к ципрофлоксацину и моксифлоксацину оказались нечувствительны 83,6% изученных культур. Аналогичные данные получены в исследовании МАРАФОН — в 2013–2014 гг. к амоксициллин/клавуланату в стационарах России были резистентны 90,0% нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae*, к комбинации тикарциллин/клавуланат — 92,7%, к пиперацил-

лин/тазобактаму — 59,3%, к ципрофлоксацину оказались нечувствительными 82,6% изученных штаммов [9]. Устойчивость клебсиелл к фторхинолонам в Европе в 2015 г. была ниже и составила в разных странах от 2,9% в Исландии до 70% в Словакии [11].

Более двух третей культур в проведенном исследовании проявляли нечувствительность к гентамицину (72,9%), в 2 раза меньшей была доля штаммов, устойчивых к амикацину (34,2%). Доля культур, нечувствительных к амикацину, была в 3 раза больше среди изолятов из МТ (47,9%), чем из РТ (16,2%). В исследовании МАРАФОН в 2013–2014 гг. в стационарах России удельный вес нечувствительных к гентамицину культур составил 59,2%, к амикацину он был значительно ниже — 18,2% [9]. Такая же картина наблюдалась в Европе — к аминогликозидам были устойчивы от 0% штаммов в Исландии до 66,5% в Болгарии [11].

В многопрофильном стационаре был выявлен высокий удельный вес нечувствительных к цефалоспорином III и IV поколения культур (79,8%), при этом такие штаммы чаще выделялись из МТ (89,7%), чем из крови (78,8%) и РТ (68,4%). Полученные нами данные коррелируют с данными по устойчивости клебсиелл к цефалоспорином в других лечебных учреждениях Санкт-Петербурга и других городов России. Так, среди 536 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 7 стационарах Санкт-Петербурга в 2012 г., удельный вес штаммов, устойчивых к цефалоспорином, составил 66,7% и колебался в различных больницах от 25,4 до 88,4% [2]. В исследовании МАРАФОН в стационарах России в 2013–2014 гг. среди 813 штаммов *K. pneumoniae* устойчивость к цефалоспорином III–IV поколения выявлена более чем у 90% изолятов [9]. В странах Европы удельный вес таких культур значительно варьировал в зависимости от их географического расположения — от 0% в Исландии до 75,0% в Болгарии, при этом доля антибиотикорезистентных штаммов была гораздо выше в южных и восточных, чем

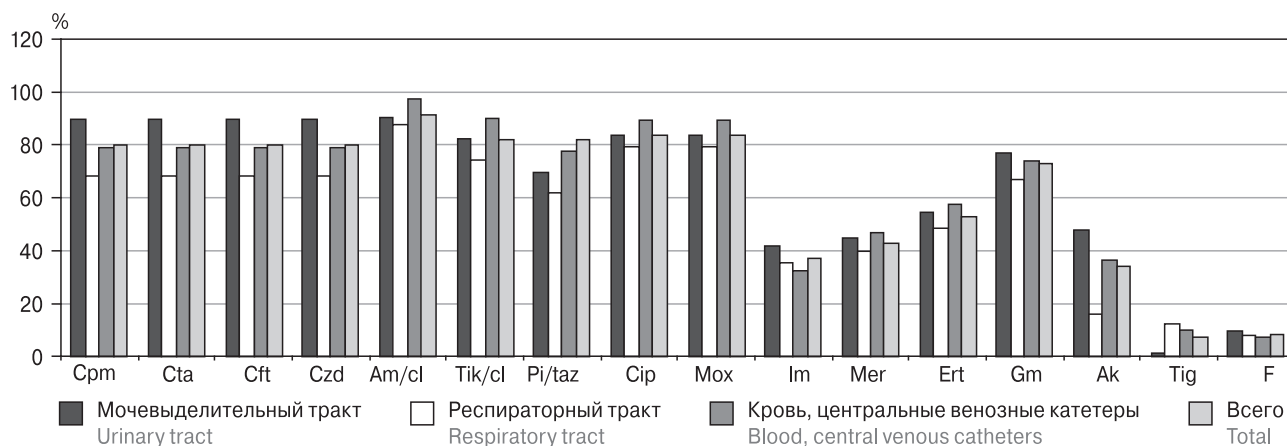


Рисунок. Устойчивость *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам

Figure. Antimicrobial resistance in *K. pneumoniae*

в северных странах [11]. Как известно, основным механизмом устойчивости к цефалоспорином у энтеробактерий является продукция бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС), при этом гены, их кодирующие, часто локализованы на плазмидах и распространяются среди микроорганизмов. *K. pneumoniae* является наиболее активным среди энтеробактерий коллектором генов и плазмид резистентности [13, 15], что, наряду с выраженной способностью микроорганизмов этого вида к колонизации [15], позволило ей стать актуальным возбудителем нозокомиальных инфекций еще с 70-х гг. прошлого столетия. Первыми появились плазмиды, кодирующие устойчивость к аминогликозидам, затем плазмиды, детерминирующие синтез БЛРС, часто совместно с резистентностью к другим АМП. Параллельно происходило накопление хромосомных мутаций, кодирующих устойчивость к фторхинолонам, а уже с 2000 г. появились и стали быстро распространяться полирезистентные штаммы *K. pneumoniae* с устойчивостью еще и к карбапенемам за счет продукции плазмидных карбапенемаз.

Широкое распространение среди клебсиелл штаммов, устойчивых к цефалоспорином, привело к увеличению частоты применения для стартовой эмпирической терапии вызываемых этими микроорганизмами инфекций карбапенемов. Еще недавно в мире удельный вес устойчивых к карбапенемам энтеробактерий оставался невысоким. Так, 2011 г. в 28 странах Европы он составлял не более 1,8% [11]. До 2011 г. считалось, что в России, в том числе и в Санкт-Петербурге, резистентность энтеробактерий к этой группе препаратов практически отсутствует. Однако в 2012 г. были опубликованы сообщения о выявлении у *K. pneumoniae* карбапенемаз VIM-4 в Москве и OXA-48 в Смоленске [14], NDM-1 в Санкт-Петербурге в многопрофильном стационаре, в котором проводилось данное исследование [1]. Удельный вес карбапенемрезистентных культур тогда был невысок. Так, в 2011–2012 гг. в данном стационаре только 6,0% энтеробактерий проявляли нечувствительность к эртапенему, 2% — к меропенему и 0,3% — к имипенему [5]. В данном исследовании в 2015 г. уже более половины изученных культур клебсиелл (53,0%) оказались нечувствительными к эртапенему, 42,8% — к меропенему и 37,1% — к имипенему, то есть всего за 3 года в условиях использования карбапенемов удельный вес карбапенемрезистентных штаммов в стационаре увеличился многократно. В исследовании МАРАФОН в стационарах 10 городов России в 2013–14 гг. доля культур *K. pneumoniae*, нечувствительных к карбапенемам, составила 31,1% изученных изолятов [9], при этом Санкт-Петербург был оценен как наиболее неблагоприятный по эпидемиологической обстановке город, так как в нем были выявлены карбапенемазы всех 4 групп [10]. В стра-

нах Европы в 2015 г. частота выделения карбапенемустойчивых культур колебалась от 0% в Исландии до 61,9% в Греции [11].

Определение детерминант резистентности к карбапенемам показало, что среди клебсиелл, циркулирующих в многопрофильном стационаре, преобладал ген *bla*_{OXA-48}, выявленный у 59,3% резистентных к карбапенемам изолятов. Вторым по частоте встречаемости оказался ген *bla*_{NDM-1} (40,7%), который впервые в России был выделен из резистентного к карбапенемам штамма *K. pneumoniae* в 2012 г. в Санкт-Петербурге [1]. Не было выявлено культур, несущих одновременно два гена, детерминирующих устойчивость к карбапенемам.

Безусловный интерес представляет ассоциированная устойчивость клебсиелл к АМП разных групп, которая приводит к формированию штаммов с фенотипом множественной (MDR) и экстремальной (XDR) резистентности. В нашем исследовании более двух третей изученных культур обладали ассоциированной резистентностью к цефалоспорином и фторхинолонам (68,2%), реже наблюдалась ассоциированная устойчивость к цефалоспорином и аминогликозидам (60,3%). Одновременная устойчивость сразу к 3 группам препаратов (цефалоспорином, фторхинолонам и аминогликозидам) в 2015 г. являлась наиболее частым фенотипом резистентности *K. pneumoniae* в Европе и составляла в разных странах от 0% в Исландии до 59,6% в Словакии [11]. В данном исследовании удельный вес штаммов, резистентных одновременно к цефалоспорином, фторхинолонам и аминогликозидам, составил 57,7% и включал 44,2% изолятов, нечувствительных еще и к карбапенемам. Все вышесказанное, безусловно, снижает эффективность использования данных комбинаций для терапии инфекций различной локализации, вызванных клебсиеллами.

Наибольшую активность в отношении *K. pneumoniae* в проведенном исследовании проявляли фосфомицин (8,5% устойчивых культур) и тигециклин (7,4%), при этом все нечувствительные к последнему препарату культуры относились к группе микроорганизмов с промежуточной устойчивостью и характеризовались минимальной подавляющей концентрацией этого препарата, равной 2 мкг/мл. Следует отметить, что удельный вес штаммов, нечувствительных к тигециклину, был значительно выше среди изолятов из РТ (12,5%) и крови (10,0%), чем из МТ (1,2%). Низкий удельный вес культур клебсиелл, устойчивых к фосфомицину, позволяет использовать данный препарат для лечения инфекций МТ в данном стационаре. К преимуществам фосфомицина можно отнести отсутствие перекрестной устойчивости с другими антимикробными препаратами, редкую плазмидную передачу генов резистентности (менее 2%), а также доказанное предупреждение адгезии возбудите-

ля к эпителию мочевыводящих путей [3]. В то же время в исследовании МАРАФОН [9] выявлен большой удельный вес изолятов *K. pneumoniae*, устойчивых к указанным препаратам: доля культур, устойчивых к фосфомицину, составила 43,5%, нечувствительных к тигециклину — 21,0%, в том числе 11% изолятов с промежуточной устойчивостью.

Клебсиеллы характеризовались большим разнообразием спектров антибиотикорезистентности. Штаммы с фенотипом множественной резистентности (MDR устойчивости к АМП, относящихся не менее чем к трем различным категориям) составили большую часть выделенных культур (87,2%), при этом удельный вес таких изолятов среди клебсиелл, выделенных из крови (90,0%) и МТ (89,7%), был выше, чем из респираторного тракта (81,6%).

Таким образом, среди клебсиелл, выделенных из различного материала пациентов многопрофильного стационара с нозокомиальными гнойно-септическими инфекциями, преобладали антибиотикорезистентные культуры с высоким удельным весом полирезистентных штаммов (87,2%). Уровень устойчивости к отдельным АМП в стационаре был сопоставим с таковым в южных и восточных странах Европы, где удельный вес резистентных к большинству АМП был значительно выше, чем в северных странах [11]. Подавляющее большинство культур проявляли нечувствительность к цефалоспорином III–IV поколения, ингибиторзащитным бета-лактамам, фторхинолонам и гентамицину, что не позволяет рекомендовать широкое применение АМП перечисленных групп в данном стационаре. Выявлен высокий удельный вес штаммов *K. pneumoniae*, нечувствительных к карбапенемам (53,0%), при этом доля та-

ких изолятов за 3 года увеличилась почти в 9 раз (с 6,0%). Устойчивость к карбапенемам у клебсиелл была детерминирована геном *bla*_{OXA-48} (59,3% резистентных к карбапенемам изолятов), либо геном *bla*_{NDM-1} (40,7% устойчивых к карбапенемам клебсиелл).

Распространение карбапенемрезистентных культур в стационаре свидетельствует о значительном снижении эффективности препаратов этой группы в отношении заболеваний, вызываемых клебсиеллами, и необходимости ограничения их неоправданного применения. Вызывает тревогу также высокий удельный вес культур с ассоциированной резистентностью к АМП разных групп — цефалоспорином, аминогликозидам и фторхинолонам, который составил более половины от общего числа штаммов (57,7%), включая 44,2% культур, устойчивых еще и к карбапенемам. Наибольшую активность в отношении *K. pneumoniae* проявляли фосфомицин (8,5% нечувствительных культур) и тигециклин (7,4%). Так как все нечувствительные к последнему изоляты относились к группе микроорганизмов с промежуточной резистентностью, в данном стационаре в связи с распространением карбапенемрезистентных штаммов тигециклин может считаться препаратом выбора для лечения инфекций, вызываемых клебсиеллами, однако можно прогнозировать в скором времени появление и распространение резистентных к нему культур. Вариабельность устойчивости клебсиелл к антимикробным препаратам и появление опасных для распространения генов резистентности штаммов подтверждает необходимость проведения постоянного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций с анализом механизмов их устойчивости.

Список литературы/References

1. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е., Шляхто Е.В. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *Klebsiella pneumoniae* в Санкт-Петербурге // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2016. Т. 18, № 3. С. 196–199. [Barantsevich E.P., Barantsevich N.E., Schlyakhto E.V. Production of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Saint Petersburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 196–199. (In Russ.)]
2. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сужайева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балодэ А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-бета-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konovalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lyubushkina M.I., Savochkina Yu.A., Makarova M.A., Suzhayeva L.V., Ostankova Yu.V., Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kylyalg S., Mitsyulyavichene I., Balode A. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo-beta-lactamases NDM-1, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infection and immunity = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36 (In Russ.)]
3. Козлов Р.С., Голуб А.В. Выбор антимикробных препаратов при неосложненных инфекциях мочевых путей: как принять соломоново решение? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 1. С. 18–25. [Kozlov R.S., Golub A.V. Choice of Antimicrobial agents in uncomplicated urinary tract infections: how to make decision worthy of Solomon? *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 18–25. (In Russ.)]
4. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г., Баранцевич Е.П. Антибиотикорезистентность энтеробактерий, выделенных из мочи пациентов многопрофильного стационара // Проблемы медицинской микологии. 2015. Т. 17,

- № 3. С. 22–26. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Ivanova L.V., Goik V.G., Barantsevich E.P. Resistance to antibiotics in enterobacteria, isolated from urine in a multidisciplinary medical centre. *Problemy meditsinskoj mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2015, vol. 17, no. 3, pp. 22–26. (In Russ.)]
5. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Иванова Л.В., Гоик В.Г., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антимикробным препаратам энтеробактерий различного происхождения в многопрофильном стационаре // Проблемы медицинской микологии. 2016. Т 18, № 3. С. 30–35. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Ivanova L.V., Goik V.G., Barantsevich E.P. Resistance to antibiotics in enterobacteria of different origin in a multidisciplinary medical centre. *Problemy meditsinskoj mikologii = Problems of Medical Mycology*, 2016, vol. 18, no. 3, pp. 30–35. (In Russ.)]
 6. Косякова К.Г., Каменева О.А., Морозова С.Е. Микробный пейзаж и уровень антибиотикорезистентности в отделении реанимации новорожденных // Профилактическая и клиническая медицина. 2015. № 2 (55). С. 12–17. [Kosyakova K.G., Kameneva O.A., Morozova S.E. Microbial landscape and the level of antibiotic resistance in the neonatal intensive care unit. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina = Preventive and Clinical Medicine*, 2015, no. 2 (55), pp. 12–17. (In Russ.)]
 7. Кофтырева Л.А., Егорова С.А., Кожухова Е.А., Макарова М.А., Козлова Н.С., Матвеева З.Н., Шестакова Т.И., Петрова Л.Ю., Кича Е.В. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций // Казанский медицинский журнал. 2009. Т. 90, № 5. С. 699–704. [Kaftyreva L.A., Egorova S.A., Kozhukhova E.A., Makarova M.A., Kozlova N.S., Matveeva Z.N., Shestakova T.I., Petrova L.Yu., Kicha E.V. Resistance of enterobacteria to antimicrobial drugs of choice in the treatment of acute intestinal infections. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2009, vol. 90, no. 5, pp. 699–704. (In Russ.)]
 8. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Т. 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. Под ред. Лабинской А.С., Костюковой Н.Н. М.: Бином, 2013. 751 с. [Rukovodstvo po meditsinskoj mikrobiologii. Kniga III. T. 1. Opportunistic infections: pathogens and etiologic diagnosis. Eds. Labinsky A.S., Kostyukovoi N.N. Moscow: Binom, 2013. 751 p.]
 9. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. и исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» в 2013–2014 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 1. С. 49–56. [Sukhorukova M.V., Eydelsteyn M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Dekhnych A.V., Kozlov R.S. and the «MARATHON» study group. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacteriaceae isolated in Russia: results of the national multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 1, pp. 49–56. (In Russ.)]
 10. Эйдельштейн М.В., Журавлев В.С., Шек Е.А. Распространенность карбапенемаз среди нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в России // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, № 1. С. 36–41. [Edelstein M.V., Zhuravlev V.S., Shek E.A. Prevalence of nosocomial strains enterobacteriaceae have carbapenemases in Russia. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya Khimiya. Biologiya. Ekologiya = Proceedings of the Saratov University. New Episode. Series Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 36–41. doi: 10.18500/1816-9775-2017-17-1-36-41 (In Russ.)]
 11. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2015. 130 p. URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23165en/s23165en.pdf> (13.03.2018)
 12. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints (2013). URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (13.03.2018)
 13. Pitout J.D.D., Nordmann P., Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, vol. 59, no. 10, pp. 5873–5884. doi: 10.1128/AAC.01019-15
 14. Shevchenko O.V., Mudrak D.Y., Skleenova E.Y., Kozyreva V.K., Ilina E.N., Ikryannikova L.N., Alexandrova I.A., Sidorenko S.V., Edelstein M.V. First detection of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2012, vol. 18, iss. 7, pp. 214–217. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03827.x
 15. Tzouveleki L.S., Markogiannakis A., Psychogiou M., Tassios P.T., Daikos G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012, vol. 25, no. 4, pp. 682–707. doi: 10.1128/CMR.05035-11

Авторы:

Козлова Н.С., к.м.н., доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Баранцевич Н.Е., научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории внутрибольничных инфекций ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Баранцевич Е.П., д.м.н., зав. отделом микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии, зав. научно-исследовательской лабораторией внутрибольничных инфекций ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kozlova N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Medical Microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;
Barantsevich N.E., Researcher, Research Laboratory of Nosocomial Infections, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation;
Barantsevich E.P., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Microbiology, Cell Technologies and Molecular Biology, Head of the Research Laboratory of Nosocomial Infections, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.09.2017
 Отправлена на доработку 27.02.2018
 Принята к печати 05.03.2018

Received 20.09.2017
 Revision received 27.02.2018
 Accepted 05.03.2018

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПЕСТИНА ПП И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO*

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, Ю.В. Сирица, Е.Л. Ракина, Е.Н. Афанасьев, М.В. Костюченко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Формирование иммунитета против инфекционных заболеваний сопровождается иммуноаллергической перестройкой организма, при этом интенсивность аллергической реакции ассоциирована с наличием специфического иммунитета. Для определения интенсивности сенсибилизации организма часто применяют кожное аллертестирование. При определении иммунитета у вакцинированных против чумы ранее в качестве аллергена предлагался пестин ПП — полипептидно-полисахаридный комплекс чумного микроба. Авторами оптимизирована методика получения препарата пестина с сохранением его химического состава, высокой специфичности и аллергенной активности. Известно, что недостатком аллергопроб *in vivo* является высокий риск формирования побочных реакций. Предложен метод оценки адаптивного противочумного иммунитета с аллергеном пестином в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro*. Получение аллергена по модифицированной методике осуществляли путем гидролиза биомассы вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ с последующим фильтрованием и лиофилизацией осадка. В полученном препарате определяли рН и концентрацию белка. Для проверки специфичности образцы подвергали спектрофотометрическому и хроматографическому анализу. Для оценки специфической активности использовали образцы крови 17 человек, иммунизированных вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ по эпидемическим показаниям. В качестве сравнительного контроля использовали стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Контингент обследовали до вакцинации, на 7, 21 сутки и через 3 месяца после иммунизации путем оценки интенсивности экспрессии базофилами CD63. Биохимический анализ полученного по модифицированной методике пестина и производных позволил судить о качественном составе, показать отсутствие примесей белковой природы, а так же определить углеводный профиль. Использование препарата в качестве аллергена для оценки формирования противочумного иммунитета у вакцинированного контингента подтвердило его специфичность. Полученные данные показали возможность и перспективу использования пестина ПП в качестве тест-аллергена для постановки реакции активации базофилов *in vitro*.

Ключевые слова: аллерген пестин ПП, противочумный иммунитет, вакцинация, спектрофотометрия, проточная цитофлуориметрия, хроматографический анализ.

Адрес для переписки:

Гостищева Светлана Евгеньевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел./факс: +7 (8652) 26-20-50 (служебн.).
E-mail: chumnpl@yandex.ru; snipchi@mail.stv.ru

Contacts:

Svetlana E. Gostischeva
355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya str., 13–15,
Stavropol Plague Control Research Institute.
Phone/fax: +7 (8652) 26-20-50 (office).
E-mail: chumnpl@yandex.ru; snipchi@mail.stv.ru

Библиографическое описание:

Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Сирица Ю.В., Ракина Е.Л., Афанасьев Е.Н., Костюченко М.В. Оптимизация метода получения пестина ПП и изучение его специфической активности *in vitro* // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 85–90. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90

Citation:

Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V. Optimization of the method of obtaining pestine PP and studying its specific activity *in vitro* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 85–90. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-85-90

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF OBTAINING PESTINE PP AND STUDYING ITS SPECIFIC ACTIVITY *IN VITRO*

Gostischeva S.E., Abzaeva N.V., Kovalev D.A., Ponomarenko D.G., Siritsa Yu.V., Rakitina E.L., Afanasyev E.N., Kostuchenko M.V.

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The formation of immunity against infectious diseases is accompanied by an immunoallergic alteration of the organism, while the intensity of the allergic reaction is associated with the presence of specific immunity. Skin allergotesting is often used to determine the intensity of sensitization of the body. When determining the immunity of vaccines against the plague, previously an allergen was suggested as a pestin PP — a polypeptide polysaccharide complex of a plague microbe. The authors optimized the technique for obtaining the preparation of pestin with preservation of its chemical composition, high specificity and allergenic activity. It is known that a lack of allergic test *in vivo* is a high risk of formation of adverse reactions. A method for estimating adaptive antiplague immunity with the allergen pestin in antigen-specific cellular tests *in vitro* is proposed. The preparation of the allergen by a modified procedure was carried out by hydrolysis of the biomass of the vaccine strain of the plague microbe *Yersinia pestis* EV of the NIEG line, followed by filtration and lyophilization of the precipitate. In the preparation obtained, the pH and the protein concentration were determined. To check the specificity, the samples were subjected to spectrophotometric and chromatographic analysis. To assess specific activity, blood samples of 17 people immunized with the plague live vaccine from the *Yersinia pestis* EV strain of the NIEG line were used for epidemic indications. As a comparative control, a sterile isotonic sodium chloride solution was used. The contingent was examined before vaccination on days 7, 21 and 3 months after immunization by evaluating the expression intensity of basophils CD63. Biochemical analysis of the obtained by the modified procedure of the pestin and derivatives allowed to judge the qualitative composition, to show the absence of impurities of the protein nature, as well as to determine the carbohydrate profile. The use of the drug as an allergen to assess the formation of antiplague immunity in the vaccinated contingent confirmed its specificity. The obtained data showed the possibility and prospect of using the Pestin PP as a test allergen for the establishment of the reaction of activation of basophils *in vitro*.

Key words: *allergen pestine PP, antiplague immunity, vaccination, spectrophotometry, flow cytometry, chromatographic analysis.*

Формирование постинфекционного и поствакцинального иммунитета против бактериальных инфекций сопровождается иммуноаллергической перестройкой организма. При этом интенсивность аллергической реакции на антиген ассоциирована с наличием и напряженностью специфического иммунитета [2].

Для определения интенсивности сенсибилизации организма при инфицировании и после иммунизации часто применяют накожное аллерготестирование с использованием бактериальных аллергенов (проба Манту, Бюрне, с тулярином, антраксин-кожный тест и др.).

Совершенствование аллергодиагностических препаратов для чумного микроба шло от корпускулярных бактериальных аллергенов к очищенным его фракциям. Для постановки внутрикожной пробы при определении иммуноаллергической перестройки организма в ответ на введение вакцины против чумы ранее использовали корпускулярный аллерген и экстракт убитой культуры — пестин безмикробный [2]. В 70-е гг. XX в. был предложен к использованию пестин ПП — одна из фракций чумного микроба, высокоактивный и специфичный аллерген для определения иммунитета у вакцинированных против чумы [3].

Анализ имеющихся данных по применению пестина в кожно-аллергических тестах для оценки иммунитета к чуме после вакцинации указывает на его эффективность с позиции до-

статочно высокой специфичности реакции. При этом авторы отмечают, что основным недостатком применения аллергена пестина *in vivo* — высокий риск формирования побочных реакций на инокуляцию антигена (ухудшение общего состояния, развитие некроза на месте введения аллергена и т. д.).

Таким образом, исследователями доказано, что применение пестина для постановки кожно-аллергической реакции позволяет выявлять специфическую сенсибилизацию к возбудителю чумы, а так же может служить объективным показателем развития клеточного иммунитета и устойчивости организма к инфекции [2, 4, 5].

Известно, что кожная реакция на аллерген *in vivo* реализуется преимущественно за счет антигенспецифических Th1-клеток (CD4 Т-клеток воспаления), факторов и медиаторов воспаления (цитокины), отражая активность клеточного иммунитета к инфекции. Авторами был предложен метод оценки адаптивного противочумного иммунитета в антигенспецифических клеточных тестах *in vitro* с аллергеном пестином.

Разработанная и предложенная Тараненко Т.М. (1967) методика получения пестина ПП, предполагающая кислотный гидролиз клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV с последующим двукратным осаждением спиртом и высушиванием полученного осадка в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием, достаточно сложна и, по-нашему мнению, требует со-

вершенствования с позиции сокращения времени и оптимизации (упрощения) процедуры получения аллергена.

Цель исследований — оптимизировать метод получения бактериального аллергена пестина ПП и подтвердить его специфичность биохимическими методами и тестами *in vitro*.

Материалы и методы

Для получения бактериального аллергена пестина ПП использовали вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ.

Спектрофотометрию водного раствора пестина и его гидролизата осуществляли на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). В качестве раствора сравнения использовали воду I типа (сопротивление 18,2 МОм/см). Анализ образцов проводили в диапазоне от 180 до 800 нм.

Хроматографический анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex Corp., США) с флуоресцентным детектором FLD-3100. Во всех экспериментах применялась колонка Reprosil-PurC18-Aq длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц 5 мкм, и предколонка Acclaim® 120 C18 длиной 10 мм и внутренним диаметром 2 мм, размер частиц 5 мкм. Элюирование осуществляли в градиентном режиме с применением двух подвижных фаз. Фаза А — 0,1 М ацетат аммония в воде рН 6,8, фаза В — ацетонитрил. Градиент: 0–1 мин — 85% А; 1–8 мин — 85–60% А; 8–11 мин — 60% А; 11–12 мин — 60–85% А; 12–15 мин — 85% А. Скорость потока 1,0 мл/мин, объем вводимого образца 5 мкл, температура колонки 30°C. Детекцию вели при длине волны возбуждения и эмиссии 336 и 530 нм соответственно. Формирование и анализ хроматограмм осуществляли в программе Chromeleon v. 6.80 (Dionex Corp.). Концентрацию белков и нуклеиновых кислот в образце пестина определяли с помощью специфической флуоресценции на предварительно откалиброванном флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). В работе использовали наборы для определения концентрации белка Quant-iT™ Protein assay kit 100 реакций (Invitrogen, США), наборы для определения концентрации ДНК Quant-iT dsDNA BR assay kit 100 реакций (Invitrogen, США), анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для оценки специфичности и специфической активности полученного пестина ПП, проводили аллергологическое обследование 17 человек, иммунизированных вакциной чумной живой из штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ по эпидемическим показаниям. В качестве сравнительного контроля антигена использовали

стерильный изотонический раствор натрия хлорида. Контингент обследовали до вакцинации, на 7, 21 сут и через 3 месяца после иммунизации. Специфическую активность аллергена учитывали в реакции активации базофилов *in vitro* с применением наборов «FlowCAST®» (Buhlmann Laboratories, Швейцария) согласно описанной авторами методике [6]. Цитометрические исследования проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Calibur (BD, США).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0. Для выявления статистической значимости различий результатов использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для получения аллергена пестина ПП по модифицированной методике, выращенную в течение 48 ч бактериальную массу *Yersinia pestis* EV подвергали гидролизу 0,1 N уксусной кислотой в течение 3 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем охлаждали до комнатной температуры и помещали на 18–20 ч в холодильник (4±2)°C на электромагнитную мешалку. Суспензию фильтровали, осадок клеток суспендировали в 1% раствора CH_3COOH и центрифугировали при 5000–6000 об./мин в течение 10–15 мин. Супернатант соединяли с фильтратом, осадок отбрасывали. Определяли рН полученного гидролизата (в пределах 7,4–7,6), концентрацию белка (4,5 мг/мл). Суспензию разливали в ампулы по 1 мл и лиофилизировали. Полученный препарат подвергали биохимическому анализу и проверке специфической активности в клеточных тестах *in vitro*.

Гидролиз препарата проводили 2М трифторуксусной кислотой при температуре 99°C с последующим испарением кислоты при пониженном давлении и температуре 30°C [10]. Для дериватизации пестина ПП 9 мкл 1% раствора дансилгидразина в этаноле смешивали с 1 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера рН 7,4 и 10 мкл 10 мМ раствора моно-/олигосахариды или гидролизата и выдерживали при 65°C в течение 20 мин [8, 9].

При исследовании спектрофотометрическим методом для интактного и гидролизованного раствора пестина были получены характеристичные спектры поглощения, которые для растворов пестина содержали два пика поглощения при 230 и 242 нм и локальный минимум при 232–238 нм. В свою очередь у гидролизатов присутствовали пики 230 нм и широкая полоса поглощения 260–310 нм с максимумами 273 и 296 нм, что по нашему мнению связано с наличием R-полосы карбонильной группы.

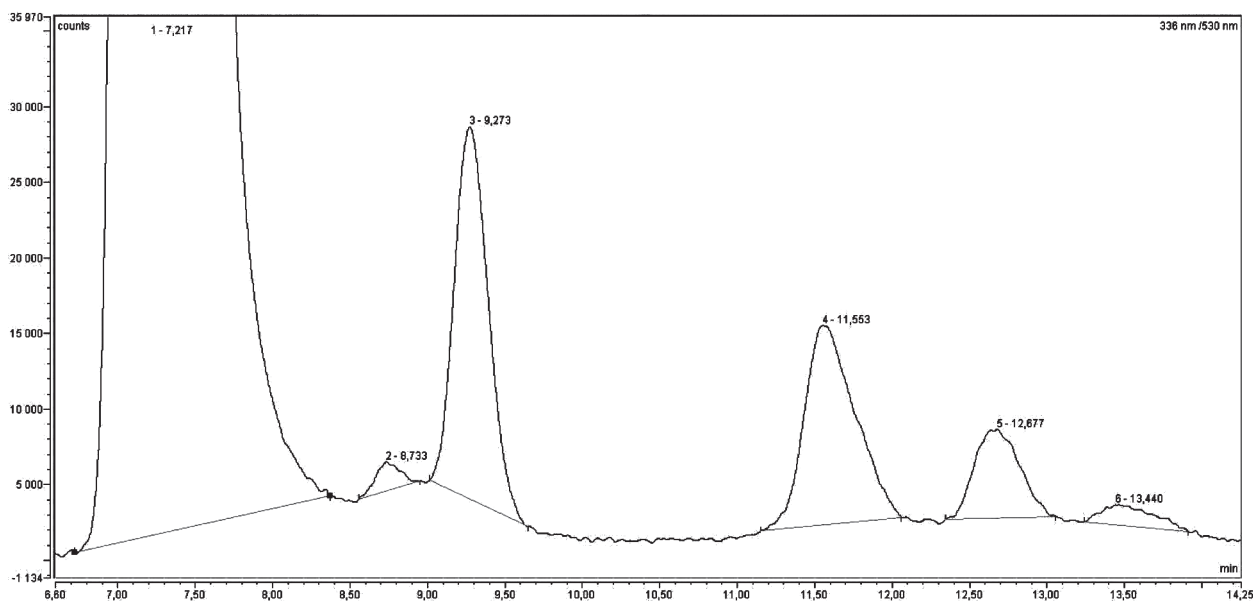


Рисунок 1. Фрагмент хроматограммы гидролизованного пестина ПП

Figure 1. The typical chromatogram of hydrolyzed pestin PP

Принимая во внимание особенности спектров поглощения отдельных классов органических соединений и оценивая соотношения поглощений, при 260/280 нм и 260/230 нм можно судить о присутствии в препарате примесей нуклеиновых кислот и белков. Значения этих соотношений для интактного пестина ПП составили $1,02 \pm 0,002$ и $1,13 \pm 0,005$, для гидролизованного раствора — $0,83 \pm 0,003$ и $1,01 \pm 0,003$, что свидетельствует о высокой степени очистки препарата от примесных нуклеиновых кислот и белков. Дополнительно для подтверждения чистоты получаемого пестина ПП была про-

ведена флуориметрия образца, которая показала низкое содержание белков $0,112 \pm 0,02$ нг/мкл и нуклеиновых кислот $1,67 \pm 0,02$ нг/мкл.

Качественный состав исходного препарата оценивали с помощью ВЭЖХ с флуоресцентной меткой. В соответствии с данными о мономерном составе пестина ПП были получены хроматограммы интактного пестина, содержащие основной пик с временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин и гидролизата пестина с пиком глюкозы (время удерживания $9,29 \pm 0,15$ мин), а также пиками с большим удерживанием ($12,66 \pm 0,1$ и $13,45 \pm 0,12$ мин), принадлежащими

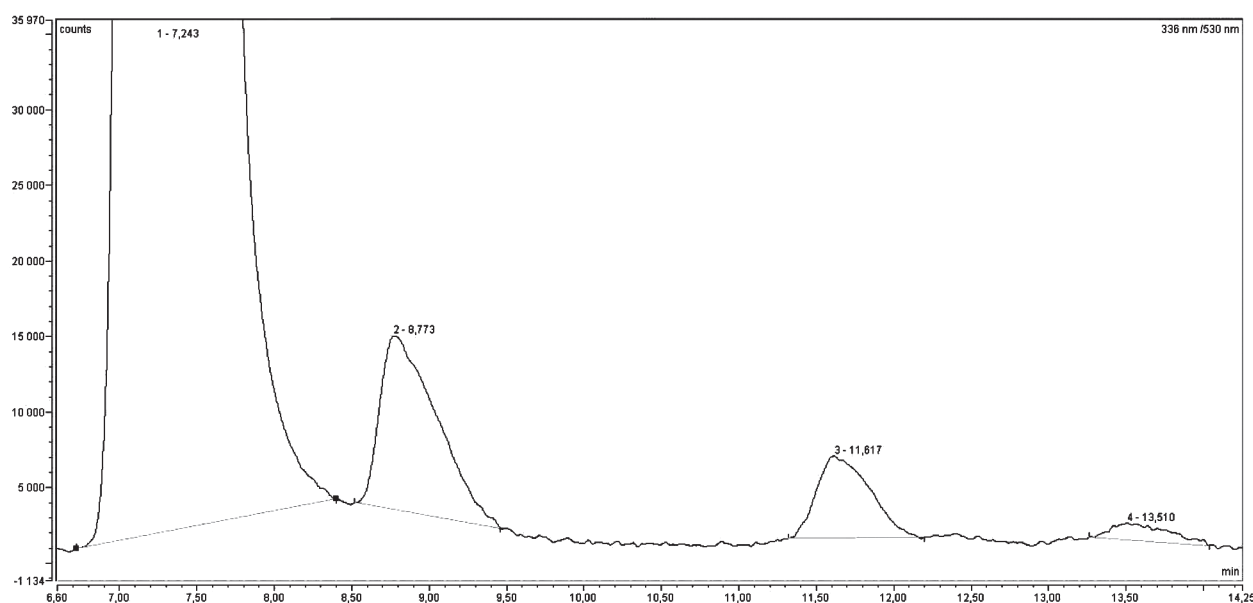


Рисунок 2. Фрагмент хроматограммы интактного пестина ПП

Figure 2. The typical chromatogram of intact pestin PP

Таблица. Оценка специфичности пестина ПП в аллергологических клеточных тестах *in vitro*, %Table. Evaluation of the pestin specificity in PP allergy cellular tests *in vitro*, %

Сроки обследования Terms of inspection	Стимулирующий антиген (пестин ПП) Stimulating antigen (Pestin PP)	Контроль (0,9% раствор NaCl) Control (0,9% solution of NaCl)
До вакцинации Before vaccination	2,12±0,51	1,74±0,58
Ч/з 7 сут после вакцинации 7 days after vaccination	15,05±1,78	1,34±0,28
Ч/з 21 сут после вакцинации 21 days after vaccination	7,45±1,84	1,52±0,36
Ч/з 3 мес после вакцинации 3 months after vaccination	5,89±0,89	1,52±0,53

рибозе, глюкозамину (рис. 1). Отсутствие на хроматограммах гидролизата пестина пика со временем удерживания $8,77 \pm 0,13$ мин связано с полным гидролизом полисахаридов, входящих в состав данного пика, на соответствующие мономеры. Свободный дансилгидразин элюируется в виде двух пиков с временами удерживания $7,22 \pm 0,02$ и $11,56 \pm 0,05$ мин (рис. 2).

Анализ результатов оценки специфичности пестина ПП в аллергологических клеточных тестах *in vitro* показал, что до вакцинации уровень антигенспецифической активации базофилов обследуемых составлял в среднем $2,12 \pm 0,51\%$, при инкубации с физраствором $1,74 \pm 0,58\%$ (контроль). На 7 сут после иммунизации наблюдали более чем двукратное увеличение количества дегранулированных базофилов — количество CD63⁺ клеток под действием аллергена повысилось в среднем до $15,05 \pm 1,78\%$, (контроль $1,34 \pm 0,28\%$). Через 21 сут после вакцинации против чумы установлено снижение значений исследуемого показателя при активации пестином до $7,45 \pm 1,84\%$, в контрольных пробах $1,52 \pm 0,36\%$. Через 3 месяца после иммунизации уровень антигениндуцированной экспрессии базофилами CD63 находился на уровне $5,89 \pm 0,89\%$, контрольные значения составили $1,52 \pm 0,53\%$ (табл.). Полученные данные подтверждают специфичность пестина как препарата для аллергодиагностики и, как следствие, оценки формирования противочумного иммунитета у вакцинированного контингента.

В результате проведенных исследований оптимизирован метод получения бактериального аллергена пестина ПП путем гидролиза с последующим фильтрованием и лиофилизацией осадка, что позволяет получить препарат, не уступающий по составу и свойствам ранее упомянутому.

Биохимический анализ полученного по модифицированной методике пестина ПП и его производных позволил сделать вывод о его качественном составе, отсутствии примесей белковой природы, а так же о согласовании углеводного профиля с ранее полученными данными [1, 7]. Используемые в работе методы могут найти применение при разработке критериев качества получаемого препарата, отклонение от которых может говорить о нарушении технологии получения.

Бактериальный аллерген пестин, полученный по модифицированной методике, обладает выраженной специфической активностью в условиях *in vitro*, не вызывает неспецифических реакций клеток *in vitro* у людей, неиммунных к возбудителю чумы. Полученный препарат можно рекомендовать в качестве тест-аллергена для постановки реакции активации базофилов *in vitro* при определении степени интенсивности специфической сенсибилизации у людей перед ревакцинацией против чумы, уровня фактической привитости и развития поствакцинального иммунитета у иммунизированного контингента.

Список литературы/References

- Бахрах Е.Э., Тараненко Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Очистка пестина фильтрацией через гель сефадекса // Проблемы особо опасных инфекций. 1968. № 2 С. 146–153. [Bakhrakh E.E., Taranenko T.M. Study of the chemical composition of the allergen Pestin PP. Purification of the pestin by filtration through the sephadex gel. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1968, no. 2, pp. 146–153. (In Russ.)]
- Белобородов Р.А., Тараненко Т.М., Бахрах Е.Э., Муравьева Н.К., Дудкова В.К. Эффективность компонентов пестина ПП при определении корреляции аллергической реактивности и приобретенной резистентности к чуме // Проблемы особо опасных инфекций. 1974. № 6 (40). С. 51–54. [Beloborodov R.A., Taranenko T.M., Bachrach E.E., Muravieva N.K., Dudkova V.K. Efficiency pestin PP components in determining the correlation of allergic reactivity and acquired resistance to the plague. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1974, no. 6 (40), pp. 51–54. (In Russ.)]
- Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 205 с. [Korobkova E.I. Zhivaya protivochumnaya vaksina [Live plague vaccine]. Moscow: Medgiz, 1956. 205 p.]

4. Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 107. С. 77–80. [Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Schukovskaya T.N. Effect of anti-plague vaccination in the functional activity of the human innate immune cells. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2011, no. 107, pp. 77–80. (In Russ.)]
5. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 2010. 507 с. [Medunitsin N.V. Vaksinologiya [Vaccination]. Moscow: Triada-X, 2010. 507 p.]
6. Патент 2574207 Российская Федерация, МПК G01N33/48. Способ дифференциации поствакцинного и инфекционного бруцеллезного процессов по степени повышенной чувствительности организма к бруцеллам в условиях *in vitro* / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Саркисян Н.С., Костюченко М.В., Куличенко А.Н., Лямкин Г.И., Голубь О.Г., Бердникова Т.В. Заявитель и патентообладатель: ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; опубл. 10.02.2016 [Patent No. 2574207 of the Russian Federation, IPC G01N33/48. The way of differentiation of postvaccine and infectious brucellosis processes according to the degree of hypersensitivity to brucella *in vitro* / Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Sarkisyan N.S., Kostyuchenko M.V., Kulichenko A.N., Lyamkin G.I., Golub O.G., Berdnikova T.V. Applicant and patent holder: Federal Public Health Institution Stavropol Scientific Research Anti-Plague Institute of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; publ. 10.02.2016]
7. Тараненко Т.М. Изучение химического состава аллергена пестина ПП. Исследование пестина методом электрофореза // Проблемы особо опасных инфекций. 1968. № 2. С. 154–157. [Taranenko T.M. Study of the chemical composition of the allergen pestin PP. Pestin study by electrophoresis. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 1968, no. 2, pp. 154–157. (In Russ.)]
8. Alpenfels W.F. A rapid and sensitive method for the determination of monosaccharides as their dansyl hydrazones by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 114, no. 1, pp. 153–157. doi: 10.1016/0003-2697(81)90466-8
9. Avigad G. Dansyl hydrazine as a fluorimetric reagent for thin-layer chromatographic analysis of reducing sugars. *J. Chromatogr. A*, 1977, vol. 139, no. 2, pp. 343–347. doi: 10.1016/S0021-9673(00)89330-9
10. Yuan X., Zeng Y., Nie K., Luo D., Wang Z. Extraction optimization, characterization and bioactivities of a major polysaccharide from *Sargassum thunbergii*. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 12:e0144773. doi: 10.1371/journal.pone.0144773

Авторы:

Гостищева С.Е., научный сотрудник научно-производственной лаборатории чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Абзаева Н.В., к.б.н., зав. научно-производственной лабораторией чумных вакцин ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Ковалев Д.А., к.х.н., зав. лабораторией биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Пономаренко Д.Г., к.б.н., зав. лабораторией бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Сирица Ю.В., младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Ракитина Е.Л., к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Афанасьев Е.Н., д.м.н., главный научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Костюченко М.В., научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Gostischeva S.E., Researcher, Scientific and Industrial Laboratory of Plague Vaccine, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Abzaeva N.V., PhD (Biology), Head of the Scientific and Industrial Laboratory of Plague Vaccine Research and Production, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Kovalev D.A., PhD (Chemistry), Head of the Laboratory of Biochemistry, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Siritsa Yu.V., Junior Researcher, Laboratory of Biochemistry, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Afanasyev E.N., PhD, MD (Medicine), Chief Researcher, Scientific and Industrial Laboratory of Drugs for Diagnosis of Especially Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation;

Kostyuchenko M.V., Researcher, Department of Clinical Immunology and Pathomorphology of Especially Dangerous Infectious Diseases, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russian Federation.

«УЧИТЕЛЬ! ПЕРЕД ИМЕНЕМ ТВОИМ...» (к 120-летию со дня рождения В.И. Иоффе)

Артем А. Тотолян

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. 14 февраля 2018 г. исполнилось 120 лет со дня рождения замечательного ученого, академика АМН СССР, выдающегося иммунолога и микробиолога Владимира Ильича Иоффе — основателя отечественной клинической и эпидемиологической иммунологии. Он создал авторитетную научную Школу, предвосхитил многие положения инфекционной иммунологии, обосновал и связал воедино теорию, эксперимент и практическое воплощение задач одновременно трех наук — микробиологии, иммунологии и эпидемиологии, тем самым создав благоприятную почву для прорыва в комплексной разработке проблем инфекционной патологии. В.И. Иоффе разработал принципы количественного анализа процессов, создал методологию титрационных тестов для оценки противoinфекционной защищенности или, наоборот, алергизации организма. Работы В.И. Иоффе доказали стрептококковую этиологию скарлатины и ревматизма, задолго до зарубежных ученых ввели понятие иммунограммы как комплексной клинико-иммунологической характеристики болезни конкретного больного, отразили многие закономерности развития и проявления болезни. В этих трудах приводятся разработанные им сравнительные характеристики экспериментальной, клинической и эпидемиологической иммунологии в качестве самостоятельных иммунологических научных направлений, различающихся по содержанию, задачам и предметам исследования. На огромном массиве экспериментальных, клинико-иммунологических и эпидемиологических данных В.И. Иоффе создал такие капитальные труды, как, например, монографии «Клиническая и эпидемиологическая иммунология», «Скарлатина», «Коклюш», «Иммунология ревматизма», которые до сих пор находятся в сфере внимания исследователей.

Ключевые слова: *инфекционная иммунология, дифтерия, скарлатина, ревматизм, общая иммунологическая реактивность.*

"THE TEACHER! BEFORE YOUR NAME..." (to the 120th anniversary of Vladimir Ilyich Ioffe)

Totolian Artem A.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. February 14th 2018 — anniversary of the famous scientist, academician of the USSR Academy of Medical Sciences, great immunologist and microbiologist Vladimir Ilyich Ioffe the founder of the Russian school of clinical and epidemiological immunology. He created an authoritative Scientific School, anticipated many concepts of infectious immunology, justified and linked together theory, experiment and practical implementation of 3 fields of science: microbiology, immunology and epidemiology thus providing a fertile ground for breakthrough in infectious pathology. Ioffe has developed the principles of quantitative analysis of processes, created the methodology of titer tests to evaluate the strength of the body's defense system or organism allergization. His works have proved long before foreign scientists that scarlet fever and rheumatic fever were streptococcal infections, introduced immunogram as clinico-immunological characteristic of the patient's disease, and reflected the patterns of disease development and manifestation. Ioffe's publications provide

Адрес для переписки:

Тотолян Артем Акович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-94-77.
E-mail: totolyan@hotmail.ru

Contacts:

Artem A. Totolian
197376, Russian Federation, St. Petersburg, acad. Pavlov str., 12,
Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-94-77.
E-mail: totolyan@hotmail.ru

Библиографическое описание:

Тотолян Артем А. «Учитель! Перед именем твоим ...» (к 120-летию со дня рождения В.И. Иоффе) // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 91–96. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-91-96

Citation:

Totolian Artem A. "The Teacher! Before your name..." (to the 120th anniversary of Vladimir Ilyich Ioffe) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 91–96. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-91-96

comparative characteristics of experimental, clinical and epidemiological immunology as independent immunological scientific areas with its own content, aim and subject of research. Based on the wealth of experimental, clinico-immunological and epidemiological data Ioffe created such fundamental works as “Clinical and Epidemiological Immunology”, “Scarlet Fever”, “Whooping Cough”, “Immunology of Rheumatism”, which are still in the researchers’ focus of attention.

Key words: *infectious immunology, diphtheria, scarlet fever, rheumatic fever, immunological reactivity.*

14 февраля 2018 г. исполнилось 120 лет со дня рождения замечательного ученого, академика АМН СССР, выдающегося иммунолога и микробиолога Владимира Ильича Иоффе. Его труды в области инфекционной патологии и иммунологии снискали ему высокий авторитет основателя отечественной клинической и эпидемиологической иммунологии. В этих областях знаний им создана крупная научная школа, успехи которой одновременно также способствовали росту научного авторитета Института экспериментальной медицины (ИЭМ), которому ученый отдал большую часть жизни.

Вряд ли кто-либо сомневается в справедливости того, что «большое видится на расстоянии». С годами стал более осязаемым и масштаб личностью В.И. Иоффе. В истории медицинской науки и ее вклада в борьбу за здоровое человечество видное место занимают исследования, направленные против инфекционной, и в том числе детской, заболеваемости. К числу тех, кто целиком посвятил себя этой благородной задаче, без сомнений принадлежит и В.И. Иоффе, к творчеству которого адресован и этот краткий очерк, не претендующий, однако, на исчерпывающий анализ деятельности ученого.

Вклад В.И. Иоффе в учение о детской инфекционной патологии огромен и заслуживает самой высокой оценки даже в наши дни. Высокая эрудиция в области медицинских наук сочеталась в нем с преданностью избранному направлению. В этом проявилась его глубинная корневая связь с традициями российской школы микробиологов и иммунологов, ведущей свое начало от такого гиганта науки, каким был С.Н. Виноградский, через его учеников В.Л. Омелянского и А.А. Владимирова к непосредственному учителю Иоффе — О.О. Гартоху. Глубокое уважение к их памяти и достижениям вело его всю жизнь.

Их имена стали неотъемлемой частью науки и истории ИЭМа, которому сам В.И. Иоффе посвятил без малого 55 лет жизни. Он начал лаборантом, а закончил руководителем крупного Отдела микробиологии и иммунологии, оставив богатое научное наследие. Его любовь и привязанность к ИЭМу вполне объяснима. Он многое сделал для авторитета института как одного из базовых очагов отечественной медицинской науки. В.И. Иоффе гордился его успехами и горько переживал нереализованные возможности и неудачи, как правило, связанные с извращениями в области биологии и павловской физиологии. Относясь к науке как к источнику нравственного воспитания человека, в 30-е гг.

он выступил в защиту научного руководителя Ленинградского института имени Л. Пастера, своего учителя Оскара Гартоха, объявленного «врагом народа». Во время известного «дела врачей» он сам вместе со своим отделом в марте 1953 г. чудом избежал репрессий.

За годы работы в ИЭМе В.И. Иоффе создал авторитетную научную школу и подготовил более 100 кандидатов и докторов наук. Его учеников можно было встретить в самых разных уголках большой страны и ближнего зарубежья.

Он превзошел многие положения инфекционной иммунологии [9]. Для того, чтобы подтвердить этот тезис следует в теоретических построениях и практических шагах ученого вычленивать то главное, что создано его большим интеллектом, непомерным трудолюбием и природной одаренностью. Он обосновал и связал воедино теорию, эксперимент и практическое воплощение задач одновременно трех наук — микробиологии, иммунологии и эпидемиологии, тем самым создав благоприятную почву для прорыва в комплексной разработке проблем инфекционной патологии. Диапазон научных интересов В.И. Иоффе был довольно большим даже в сравнении с учеными его поколения — людьми высокой эрудиции, широкого кругозора и научной компетентности. Его характеризовали оригинальность и четкость мышления, скрупулезность в исследованиях и дар научного предвидения. Его работу в науке можно отнести к тому виду человеческой деятельности, который называют служением — он верой и правдой служил науке.

Он мог на основании одного, казалось бы незначительного, частного, факта подняться до обобщения в оценке сути того или иного патологического явления. Так, например, в 40–50-х гг. В.И. Иоффе с сотрудниками описали феномен некоего «иммунологического родства» бактерий и тканей, в которых эти бактерии размножаются. Феномен был назван «признаком состояния микроорганизма». По мере пассажей на искусственных средах признак ослабевал и «сходил на нет». Природа феномена оставалась «в тумане», а через два десятка лет, когда ему показали снимки стрептококка, паразитирующего внутриклеточно в человеческом эпителии, он воскликнул: «Вот ведь они, признаки состояния!» — бактерии, вернее их поверхностные структуры, на фото были увешаны «обломками» цитоплазматического ретикулоума клеток.

Основные труды В.И. Иоффе посвящены закономерностям и особенностям развития ин-

фекционных процессов и иммунитета при детских каплевидных инфекциях: скарлатине и другой стрептококковой патологии, дифтерии, коклюше, кори — они легли в основу разработанных им концептуальных положений по теории и практике клинической и эпидемиологической иммунологии, а позже и иммунопатологических процессов. Изучались не только сами возбудители и их взаимодействие с системами врожденного и приобретенного иммунитета, но и факторы патогенности возбудителей, иммунологически активные ферментные системы, протективность антигенов, роль феномена бактериофагии. Постоянно обогащался методический арсенал за счет возможностей иммунохимии, иммунолюминесценции, электронной микроскопии, а также генетики микроорганизмов. Таков огромный исследовательский диапазон В.И. Иоффе, в котором просматривается внутренняя логическая связь между разными направлениями его работ. В данной реминисценции невозможно уделить всем разделам одинаковое внимание. На одних остановимся более, на других менее подробно, а некоторые лишь перечислим.

На протяжении многих десятилетий анализ инфекционных процессов обычно ограничивался изучением динамики антител к возбудителю и его антигенам в сыворотках больных. Задолго до аналогичных зарубежных работ В.И. Иоффе доказал возможность изучения динамики микробных антигенов в крови больных. Идея, поначалу воспринятая скептически, оказалась весьма перспективной и была возведена в рациональный принцип «полного серологического анализа», основанного на одновременном выявлении в организме больного динамики антигена и антител к нему. Принцип оказался весьма полезным как для изучения природы заболеваний, так и для оценки микробного очага и анализа стадий патологического процесса. Клиническая, эпидемиологическая и даже диагностическая ценность такого подхода вряд ли может вызвать какие-либо сомнения и в современных условиях.

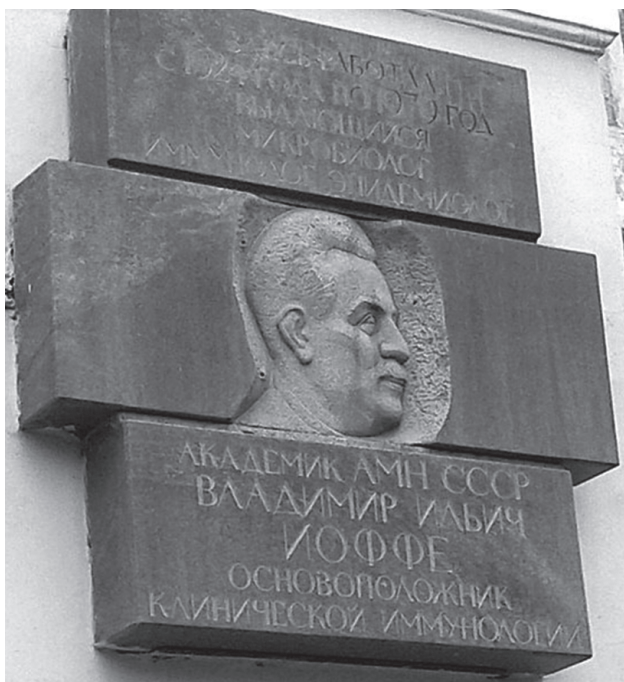
К числу наиболее значительных научных успехов В.И. Иоффе несомненно относится созданное им учение об общей иммунологической реактивности (ОИР) [6]. По своей сути оно рождено в духе лучших традиций отечественной медицины как учение о потенциальной иммунологической реактивности организма, его способности отвечать на любое антигенное воздействие. Верный неизменному стремлению не только качественно, но, что особенно важно, и количественно оценивать изучаемые иммунологические феномены, он достиг успеха в разработке системы внутрикожных тестов на предмет оценки уровня индивидуальной иммунологической реактивности каждого конкретного человека.

Примечательно, что к этой проблеме он обратился во время Великой Отечественной войны



и блокады Ленинграда, когда изучение реактивности организма в экстремальных условиях стало велением времени. В эти годы он работал флагманским эпидемиологом Краснознаменного Балтийского флота и воочию наблюдал глубокие изменения, которые в условиях осажденного города происходили в формировании и развитии многих заболеваний, в том числе и инфекционных процессов. Значительные исследования, параллельно выполненные на больших группах здоровых и больных, позволили четко установить уровень реактивности отдельных людей и даже контингентов. Они выявили резкое снижение иммунологической реактивности у жителей и защитников блокадного города и обосновали проведение избирательных мер профилактики в случаях особого риска. Многими годами позже с помощью того же теста на ОИР удавалось успешно выявить лиц с разным уровнем реактивности среди рабочих вредных производств или членов малых изолированных коллективов еще до возникновения у них тех или иных, в том числе профессиональных, заболеваний. Тест позволял прогнозировать как течение заболеваний, так и развитие осложнений в зависимости от того или иного исходного «фона» ОИР у пациента.

Наиболее информативной оказалась оценка уровня ОИР в сочетании с оценкой уровня сенсibilизации организма к конкретным антигенам. Прогностически наименее благоприятным оказалось сочетание низкой ОИР с высоким уровнем сенсibilизации, а наиболее благо-



приятным — высокая ОИР при отсутствии или крайне низкой сенсбилизации. Очевидность и внутренняя логика этого заключения получили строгое и количественное доказательство.

Таким образом, В.И. Иоффе смог логично расчленил мало что говорящее понятие «общая реактивность организма» на компоненты, выделив наиболее весомую составляющую — «общую иммунологическую реактивность». При этом он ни в коем случае не смешивал «иммунологическую» реактивность с «физиологической», но устанавливал между ними некоторую зависимость, что позволило ему использовать ОИР широко, отнюдь не ограничиваясь исключительно рамками собственно инфекционной патологии.

Тест на ОИР оказал пользу в вопросе выявления групп риска практически при любой патологии. Показатели ОИР целесообразно было использовать для прогнозирования состояния людей в случаях, которые сегодня относят к экологическим бедствиям и которыми занимается иммунология катастроф. Данный критерий во многом отражал зависимость формы, тяжести поражения и риска формирования осложнений от уровня ОИР. В.И. Иоффе установил водораздел между иммунитетными (то есть защитными) реакциями организма и его склонностью к аллергическим и иммунопатологическим состояниям.

Возрастающий интерес к феномену ОИР стал особенно понятен, когда через многие годы после В.И. Иоффе были созданы диагностические системы для выявления иммунодефицитов и для определения иммунологического статуса организма. Его труд фактически тем самым получил новое решение и толкование в терминах и функциях иммуно-компетентных клеток крови. Предложенный им внутрикожный тест, как

более простой, более доступный и безопасный, мог бы оказаться не менее информативным для применения в условиях широкого круга медицинских учреждений, тем более что он не имеет аналогов в мировой литературе до настоящего времени. Приоритет В.И. Иоффе в этом вопросе не подлежит сомнению — в год его смерти была опубликована монография, посвященная теоретическому обоснованию и практическому использованию теста на ОИР. Она разошлась за считанные недели. История науки знает немало примеров первоначального неприятия значительных творений человеческой мысли и духа. Можно надеяться, что время исправит их взаимоотношения с «общепринятым» мнением, ведь, как говорилось выше, «большое видится на расстоянии».

Последние 50 лет в науке высоко актуальным был вопрос о механизмах лиганд-рецепторного взаимодействия. Еще в 60-х гг. по предложению В.И. Иоффе он изучался на модели взаимодействия бактерий и специфических бактериофагов, а также в системе Hfr+ и F- конъюгирующих пар бактерий. Проблема взаимосвязи лиганда и рецептора решалась иммунологически не на указанных биологических партнерах, а при смешении антисывороток к соответствующим лигандным и рецепторным структурам. На первый взгляд, было показано невозможное — между собой реагировали антитела к структурам биологических объектов, то есть комплементарными друг другу оказались не только лиганды и рецепторы, но и соответствующие им антитела [10]. Простота и оригинальность решения вопроса и очевидность результата не сразу получили признание.

Выше указывалось, что В.И. Иоффе избегал описательности в изучаемых им процессах, будь то бактериологический, эпидемиологический или иммунологический процесс. Постоянно стремясь к их количественной характеристике, он тем самым избегал проявления субъективности либо уменьшал риск ее возникновения. Большинство принципиальных положений его статей и книг базируется на объективных данных об инфекционных процессах, о динамике микробных очагов, иммунологических показателях и оценках серологических реакций. Сегодня это является нормой для большинства медико-биологических наук, но в те годы подходы такого рода были по сути пионерскими. Он разработал принципы количественного анализа процессов, например для определения ОИР, и создал методологию титрационных тестов для оценки противоиной защитности или, наоборот, алергизации организма. Она, например, позволила формировать группы высокого риска развития инфекции, состоящие из лиц, подлежащих обязательной вакцинации. Кроме того, этот подход вычленил группы лиц, резистентных к инфекции и не нуждающихся

в прививках вообще. Подобные подходы оправдали себя при изучении ряда детских инфекций и, в первую очередь, дифтерии. Сегодня этот подход мог бы оказаться полезным, особенно для установления эпидемиологически допустимого и оправданного порога «отводов» от прививок против ряда возбудителей инфекций.

В 40–60-е гг. В.И. Иоффе возглавлял Комитет по детским капельным инфекциям при органах здравоохранения Ленинграда, где вместе с врачами-практиками разработал систему иммунологического мониторинга и рациональной иммунизации против дифтерии. Благодаря ей, в 1958 г. Ленинград стал первым в стране городом, ликвидировавшим дифтерию как эпидемическое заболевание. Почти 40 лет система тщательно соблюдалась и поэтому защищала население от дифтерии. Бесценный опыт обобщен в труде «Опыт борьбы с дифтерией в Ленинграде» [8]. В нем пророчески звучало предупреждение: «...Изложенное позволяет считать достигнутое положение достаточно стабильным при условии, что действие иммунологического фактора, лежащего в основе всего, не будет ослаблено, а сохранится на высоком уровне». Десятилетие годы XX в. ознаменовалось выраженной вспышкой заболевания на фоне нарушения этого контрольного принципа за динамикой иммунитета населения. В борьбе с новой волной дифтерии, прежде чем предлагать новые решения проблемы, следует вернуться к ленинградскому опыту борьбы с этой инфекцией, к опыту, творцом которого был В.И. Иоффе.

На основе многолетнего изучения стрептококковой инфекции В.И. Иоффе разработал новый постулат, условно отнесенный к практике прививочной профилактики [1]. Он допускал так называемую «малую иммунизацию» людей, которая нередко имеет место в форме естественного процесса, приводящего в итоге к стимулированию механизмов естественной иммунизации. При этом иммунитет созревает в результате «бытовой» иммунизации, например в организованных коллективах.

На огромном массиве экспериментальных, клинико-иммунологических и эпидемиологических данных Иоффе создал такие капитальные труды, как, например, монографии «Клиническая и эпидемиологическая иммунология» [4], «Скарлатина» [5], «Коклюш» [7], «Иммунология ревматизма» [3]. Последняя в 1965 г. была удостоена премии АМН СССР имени академика Н.Д. Стражеско. Это была достойная оценка его заслуг перед ревматологией. Этот труд и сегодня находится в сфере внимания исследователей. Парадоксально, что в 1974 г. в АМН не поддержали его выдвижение на Ленинскую премию в составе группы сотрудников академии за цикл работ по изучению патогенеза, клиники, диагностики, лечения и профилактики ревматических заболеваний.

Работы В.И. Иоффе доказали стрептококковую этиологию скарлатины и ревматизма, долго до зарубежных ученых ввели понятие иммунограммы как комплексной клинико-иммунологической характеристики болезни конкретного больного, отразили многие закономерности развития и проявления болезни. В этих трудах приводятся разработанные им сравнительные характеристики экспериментальной, клинической и эпидемиологической иммунологии в качестве самостоятельных иммунологических научных направлений, различающихся по содержанию, задачам и предметам исследования. Согласно его представлениям, первое направление нацелено на изучение общих и частных иммунологических закономерностей, а также отдельных иммунологических феноменов в модельных условиях, второе дает индивидуальную иммунологическую характеристику конкретного заболевания человека, между тем как третье направлено на выявление иммунологических закономерностей эпидемиологического процесса в коллективе либо в популяции. Для тех, кто знаком с трудами В.И. Иоффе, с его подходом к изложению и трактовке материала, становится очевидным, что в них нельзя отрывать ученого-микробиолога от ученого-иммунолога или ученого-эпидемиолога. В его творческой лаборатории присутствовало не одно, а несколько начал, переплетенных друг с другом и дополняющих друг друга. И во всем этом была, как господствующая, одна доминанта, одна цель: поиск закономерностей патологических процессов. До конца своих дней он сохранил верность той школе, из которой вышел.

С именем Иоффе связано также становление современного этапа в развитии иммунологии в стране. Об этом говорит разработанная им классификация иммунопатологических процессов, созданная по материалам клинического и экспериментального изучения закономерностей формирования этих процессов в соединительной ткани, нервной и мочевыделительной системах. Благодаря этому, возглавляемый им отдел в те годы стал признанным лидером в области иммунопатологических исследований.

Вера в возможности ИЭМа диктовалась высокой квалификацией его ученых и университетским типом его структуры. В.И. Иоффе культивировал в нем развитие ряда разнонаправленных междисциплинарных исследований. В течение многих лет он вел совместные исследования с другими отделами: с патологами — в области изучения аутоинфекций, патогенеза аллергических демиелинизирующих заболеваний в центральной и периферической нервной системе; с биохимиками — по генезу атеросклеротических процессов; с физиологами — в области иммуногенеза. Их итоги обобщены в совместных статьях и монографиях, в которых большое место отводилось и методологии науки,

в частности злободневному и сегодня вопросу об адекватности используемых экспериментальных моделей задачам научных разработок [2]. Среди нескольких дипломов, подтверждающих приоритет института в актуальных научных открытиях, присутствуют два диплома, полученные за комплексные разработки по физиологии иммунитета и иммунологии атеросклероза.

Позиция В.И. Иоффе в вопросах организации науки актуальна и сегодня. Он не уставал отмечать: «Комплексный характер исследований является *conditio sine qua non* — то есть обязательным либо необходимым условием существования такого многопрофильного НИИ, как ИЭМ». Эту мысль он всегда подкреплял делом и страстной влюбленностью в науку. Естественно, что В.И. Иоффе считал, что многолетняя история института в отечественной науке делает возможной и целесообразной постановку вопроса о создании на его базе комплексного в своей основе филиала АМН либо Центра экспериментальной медицины.

В этой статье хотелось рассказать о В.И. Иоффе — ученом и человеке, каким он раскрывается сегодня, почти через 40 лет после его смерти. В заключение приведем слова, сказанные им самим за год до смерти на Ученом совете ИЭМ 14 февраля 1978 г., когда Институт отмечал его 80-летие. Они звучат как обращение к новому поколению ученых: «Меня застигают на этой неделе врасплох, отмечая календарную дату. Надо думать, что это относится к тому, что ушедшие годы были прожиты небесполезно, и что более 50 лет ушли на работу в этом Институте. Принято и следует упомянуть добрым словом учителей. Воспользуюсь для этого старым изречением: “Многому я научился у своих учителей, более того — у товарищей, всего же больше — у учеников. И всем им большое спасибо”». Много ли сегодня людей, имеющих право на подобные высказывания? Он учил и учился одновременно. В приведенной фразе была не только дань искреннего уважения к коллегам, но и глубокий смысл его жизненного кредо.

Список литературы/References

1. Вопросы иммунологии и эпидемиологии скарлатины и стрептококковых инфекций / Под ред. В.И. Иоффе. Л.: Медгиз, 1956. 227 с. [Voprosy immunologii i epidemiologii skarlatiny i streptokokkovykh infektsii. Pod red. V.I. Ioffe [Questions of immunology and epidemiology of scarlet fever and streptococcal infections. Ed. V.I. Ioffe]. *Leningrad: Medgiz, 1956. 227 p.*]
2. Жаботинский Ю.М., Иоффе В.И. Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы. Медгиз, Л., 1975. 264 с. [Zhabotinskii Yu.M., Ioffe V.I. Eksperimental'nye allergicheskie demieliniziruyushchie zabolevaniya nervnoi sistemy [Experimental allergic demyelinating diseases of the nervous system]. *Leningrad: Medgiz, 1975. 264 p.*]
3. Иоффе В.И. Иммунология ревматизма. Л.: Медгиз, 1962. 356 с. [Ioffe V.I. Immunologiya revmatizma [Immunology of rheumatic disease]. *Leningrad: Medgiz, 1962. 356 p.*]
4. Иоффе В.И. Клиническая и эпидемиологическая иммунология. Л.: Медгиз, 1968. 373 с. [Ioffe V.I. Klinicheskaya i epidemiologicheskaya immunologiya [Clinical and epidemiological immunology]. *Leningrad: Medgiz, 1968. 373 p.*]
5. Иоффе В.И. Скарлатина: микробиологическая и иммунологическая характеристика. М.: АМН СССР, 1948. 439 с. [Ioffe V.I. Skarlatina: mikrobiologicheskaya i immunologicheskaya kharakteristika [Scarlet fever: microbiological and immunological characteristics]. *Moscow: USSR Academy of Medical Sciences, 1948. 439 p.*]
6. Иоффе В.И., Иоаннесян-Зверкова Б.И. Общая иммунологическая реактивность. Л.: Медгиз, 1979. 184 с. [Ioffe V.I., Ioannesyan-Zverkova B.I. Obshchaya immunologicheskaya reaktivnost' [General immunological reactivity]. *Leningrad: Medgiz, 1979. 184 p.*]
7. Иоффе В.И., Осипова П.В., Склярова Н.И., Козлова Н.А. Коклюш. Л.: Медгиз, 1964. 283 с. [Ioffe V.I., Osipova P.V., Sklyarova N.I., Kozlova N.A. Koklyush [Whooping cough]. *Leningrad: Medgiz, 1964. 283 p.*]
8. Опыт борьбы с дифтерией в Ленинграде / Под ред. В.И. Иоффе. Л.: Медгиз, 1962. 192 с. [Opyt bor'by s difteriei v Leningrade. Pod red. V.I. Ioffe [Experience in diphtheria control in Leningrad]. *Leningrad: Medgiz, 1962. 192 p.*]
9. Тотолян А.А., Софронов Б.Н. Ученый, опередивший свое время // Вестник Российской академии медицинских наук. 1994. № 3. С. 59–62. [Totolian A.A., Sofronov B.N. A scientist ahead of his time. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences, 1994, no. 3, pp. 59–62. (In Russ.)*]
10. Ioffe V.I., Rozental K.M., Totolyan A.A. Complementary nature of receptor structures of bacteriophages and sensitive bacterial cells. *Bull. Exp. Biol. Med., 1968, vol. 66, no. 2, pp. 901–903.*

Автор:

Тотолян Артем А., академик РАН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

Author:

Totolian Artem A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Molecular Microbiology, Head Researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила в редакцию 27.02.2018
Принята к печати 05.03.2018

Received 27.02.2018
Accepted 05.03.2018

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. С февраля 2016 года журнал «Инфекция и иммунитет» публикует статьи на двух языках (русском и английском).

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. Непубликованные 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. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. 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. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tif (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, в любом месте 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. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в т.ч. системы www.e-library.ru . 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://iimmun.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.agrk.org — индекс 41392.
 Цена свободная.
 Подписка на электронную версию журнала
 на сайте www.elibrary.ru**

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абзаева Н.В.	85	Костюченко М.В.	85	Рогачева Е.В.	61
Антипова А.Ю.	61	Кравченко Т.Б.	33	Рощина Н.Г.	61
Афанасьев Е.Н.	85	Краева Л.А.	61	Руднева И.А.	25
Баранцевич Е.П.	79	Кунилова Е.С.	61	Рябко А.К.	33
Баранцевич Н.Е.	79	Курова Н.Н.	61	Сварваль А.В.	61
Бахтеева И.В.	33	Куш А.А.	25	Сирица Ю.В.	85
Беспалова Г.И.	61	Лаврентьева И.Н.	61	Соколова Т.М.	25
Бурмистрова А.Л.	54	Лагурева А.В.	43	Сомова Л.М.	43
Гончаров А.Г.	19	Лев И.О.	33	Стойнова Н.А.	61
Гостищева С.Е.	85	Ломтатидзе Л.В.	7	Сухорук А.А.	71
Дробот Е.И.	43	Ляпун И.Н.	43	Тимофеев В.С.	33
Евглевский А.А.	7	Масалова О.В.	25	Тимофеева А.В.	54
Желтакова И.Р.	61	Мокриевич А.Н.	33	Тимофеева Е.В.	61
Захаров К.А.	71	Нгуен Т.З.Л.	7	Тимофеева Т.А.	25
Зуева Е.В.	61	Нестерова И.В.	7	Титарева Г.М.	33
Кафтырева Л.А.,	61	Нохрин Д.Ю.	54	Токаревич Н.К.	61
Климова Р.Р.	25	Огнева С.Д.	43	Тотоян Артем А.	91
Ковалев Д.А.	85	Плехова Н.Г.	43	Устинова М.В.	19
Ковалева С.В.	7	Полосков В.В.	25	Филиппова Ю.Ю.	54
Козлова Н.С.	79	Пономаренко Д.Г.	85	Хамитова И.В.	61
Колесникова Н.В.	7	Порин А.А.	61	Чудилова Г.А.	7
Кондрашова Н.М.	43	Продеус А.П.	19	Шувалов А.Н.	25
Корсунский А.А.	19	Ракитина Е.Л.	85	Эсауленко Е.В.	71
				Яковлев А.А.	71

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллерген пестин ПП.	85	парвовирусная инфекция.	61
антибиотикорезистентность.	79	противочумный иммунитет.	85
антибиотикоустойчивость.	33	проточная цитофлуориметрия.	85
антимикробные препараты.	79	ревматизм.	91
бруцеллез.	61	реперфузия.	19
брюшной тиф.	61	реструктуризация хроматина.	7
вакцина.	71	ротовая полость.	54
вакцинация.	85	сепсис.	19
вирусные РНК.	25	септический шок.	19
вирусы гриппа А.	25	сероконверсия.	71
генетическое разнообразие.	33	серопротекция.	71
гены β-лактамаз.	33	система комплемента.	19
гепатит В.	71	скарлатина.	91
гипертермия.	43	слюна.	54
дифтерия.	61, 91	спектрофотометрия.	85
здоровые дети.	54	среднеазиатский подвид.	33
иммуногенность.	71	тепловой стресс.	43
иммунофенотип.	7	ТНР-РМА макрофаги.	25
инфекционная иммунология.	91	трудовые мигранты.	61
инфекция.	25	ферменты.	43
ишемия.	19	хеликобактерная инфекция.	61
карбапенемазы.	79	хроматографический анализ.	85
лептоспироз.	61	цитокинпродукция.	7
лихорадка Ку.	61	цитопатогенное действие.	25
мазок.	54	экстрацеллюлярные сети.	7
макрофаги.	43	<i>Alcaligenes</i> spp.	54
микробиота.	54	<i>Fransisella tularensis</i>	33
микробицидность.	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	79
многопрофильный стационар.	79	NP-белки.	25
нейтрофилы.	43	pre-S1/pre-S2/S.	71
нейтрофильные гранулоциты.	7	Sci-B-Vac™.	71
нозокомиальные инфекции.	79	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	43
общая иммунологическая реактивность.	91	β-лактамазная активность.	33

Иллюстрация к статье «Сравнительная характеристика развития инфекции вирусом гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9 в макрофагах, дифференцированных из моноцитов ТНР-1» (авторы: Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева, Р.Р. Климова, О.В. Масалова, А.А. Куц) (с. 25–32)

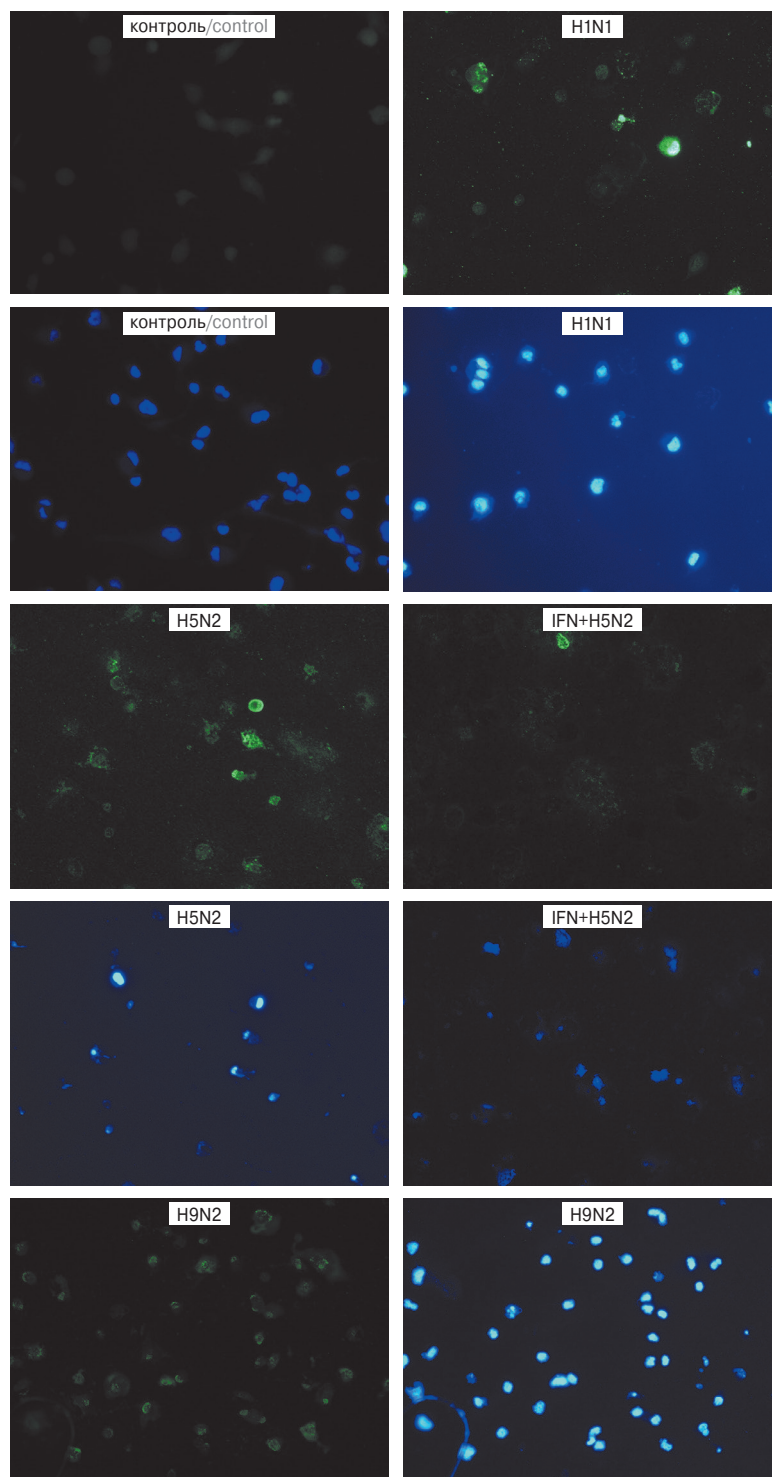


Рисунок 3. Иммуноцитохимическое выявление белка NP вирусов гриппа А в ТНР-РМА Мф методом иммунофлюоресценции через 24 ч после заражения

Figure 3. Immunocytochemical detection of NP protein of influenza A viruses in THP-PMA Mφ by immunofluorescence 24 h after infection

Примечания. Окраска мышиными МКА к NP вируса гриппа H1N1. Клетки, отмытые от МКА, инкубировали с антимышиными FITC-мечеными МКА. Для окраски клеточных ядер использован Hoechst 33258. Окраска NP белка — зеленая, ядер — голубая. Увеличение $\times 200$.

Notes. Staining with mouse MAb to NP virus of influenza H1N1. Cells washed from MAb were incubated with anti-mouse FITC-labeled MAb. For the visualization of cell nuclei, Hoechst 33258 is used. The color of NP protein is green, the nucleus is blue. Magnification $\times 200$.

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

