

2018



ИНФЕКЦИЯ
И
ИММУНИТЕТ

Иллюстрации к статье «Регуляция иммунного ответа против *Mycobacterium tuberculosis* популяцией дендритных клеток DCreg» (авторы: Э.И. Рубакова, М.А. Капина, Н.Н. Логунова, К.Б. Майоров, А.С. Апт) (с. 169–174)

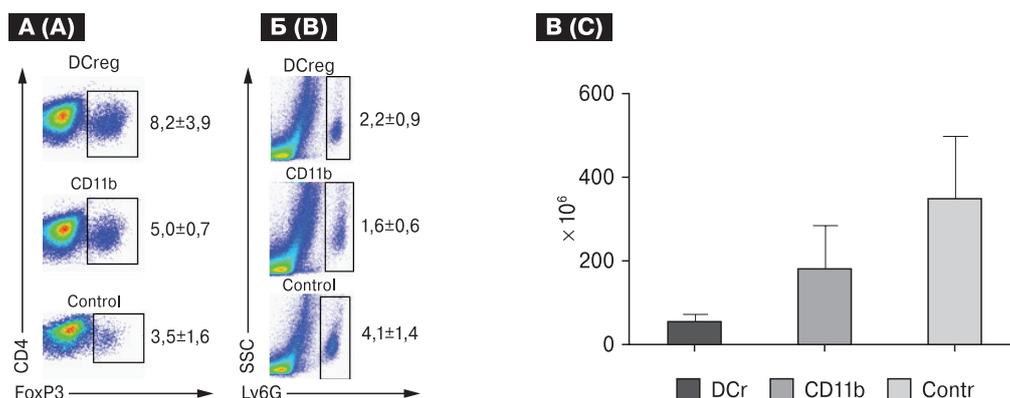


Рисунок 1. Адоптивный перенос DCreg зараженным мышам увеличивает количество клеток Treg (CD4⁺FoxP3⁺) в легочной ткани зараженных ТБ мышей (А), снижает инфильтрацию легких нейтрофилами (Б) и замедляет размножение микобактерий (В)

Figure 1. Adoptive transfer of DCreg to infected mice increases the number of Treg cells (CD4⁺FoxP3⁺) in the lung tissue of infected mice (A), reduces pulmonary infiltration with neutrophils (B), and slows the reproduction of mycobacteria (C)

Примечание. Данные цитофлуорометрии приведены для конкретных репрезентативных животных, статистика (среднее±SEM) отражает результаты, полученные для сравниваемых групп животных (N = 4–7 на группу). Для данных цитофлуорометрии p < 0,05, для данных по количеству CFU в легких p = 0,038 для реципиентов DCreg по сравнению с контролем (control), ANOVA. Для интерпретации данных по контролю CD11b см. текст.

Note. Cytofluorometry data are given for specific representative animals, statistics (mean±SEM) reflect the results obtained for the compared groups of animals (N = 4–7 per group). For cytofluorometry data p < 0.05, for data on the number of CFU in the lung p = 0.038 for DCreg recipients compared to control, ANOVA. For interpretation of CD11b control data see text.

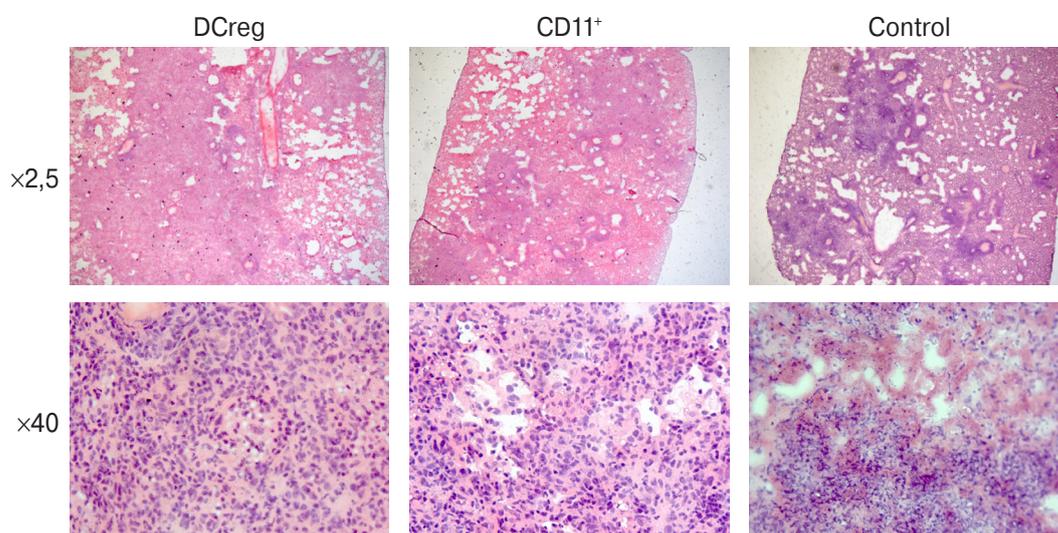


Рисунок 2. Микроскопическая картина патологии легких у зараженных животных трех сравниваемых групп при малом, обзорном (верхний ряд) и большом (нижний ряд) увеличении

Figure 2. Microscopic picture of lung pathology in infected animals of three compared groups with small, overview (upper row) and large (lower row) increase

Примечание. На обзорных препаратах паренхимы легкого у реципиентов DCreg и клеток CD11b видны обширные участки инфильтрации, а в контрольной группе — очаги воспаления неправильной формы. При большем увеличении в первых двух группах обнаруживаются мелкие гранулемы и отсутствует некроз ткани, а в контрольной группе — множественные мелкие очаги деструкции ткани и зоны некроза. Окраска гематоксилином-эозином.

Note. On the overview preparations of lung parenchyma, DCreg recipients and CD11b cells show extensive infiltration sites, and in the control group — foci of irregularly shaped inflammation. With a larger increase in the first two groups, small granulomas are found and necrosis of the tissue is absent, and in the control group there are multiple small foci of tissue destruction and necrosis zones. Staining with hematoxylin-eosin.

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

апрель–июнь

2018, том 8

№ 2

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

Главный редактор

Тотолян 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
Лоуэир 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 Ангелюффа, 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
Тотолян 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., д.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 18.06.2018 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 18.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1168

© 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)

April–June

2018, volume 8

No. 2

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, N.F. Gamaleya Federal Center 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, 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 Director, 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, Scientific Director, Orenburg, Russian Federation
Boris I. Vishnevsky	PhD, MD (Medicine), Professor, Research Institute of Phthiopulmonology, 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 18.06.2018. Print format 60 x 90 1/8.

Offset printing. Printed sheets 18.

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

Шпынов С.Н., Поздниченко Н.Н., Гуменюк А.С., Скиба А.А.

ГЕНОСОСИТЕМАТИКА РИККЕТСИЙ 107

Шен С.-Ф., Гуан В.-С., Ду Дж.-Ф., Пузырева Л.В.

НАРУШЕНИЕ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ СЕПСИСЕ 119

Пасечник О.А., Блох А.И.

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ВИЧ-1 В РЕГИОНАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СТРАН СНГ:
СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТААНАЛИЗ** 127

Боева Е.В., Беляков Н.А.

СИНДРОМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ 139

Оригинальные статьи

Матвеева Л.В., Капкаева Р.Х., Чудайкин А.Н., Мишанина Л.С.

**ИЗМЕНЕНИЯ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОАТТРАКТАНТНОГО ПРОТЕИНА-1 ПРИ *HELICOBACTER PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫХ
ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ** 150

Коленчукова О.А., Гвоздев И.И., Горбачева Н.Н., Литвинова И.С.

**КИСЛОРОДОЗАВИСИМЫЙ ФАГОЦИТОЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С *HELICOBACTER PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМ
ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА И 12-ПЕРСТНОЙ КИШКИ** 157

Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Макарова М.А., Егорова С.А., Забровская А.В., Сужаева Л.В., Зуева Е.В., Кафтырева Л.А.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ *SOMAMONAS KERSTERSII* ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА
ЖИТЕЛЕЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ** 164

Рубакова Э.И., Капина М.А., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С.

**РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ *Mycobacterium tuberculosis* ПОПУЛЯЦИЕЙ
ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК DCreg** 169

Маничева О.А., Догонадзе М.З., Мельникова Н.Н., Вишневский Б.И., Маничев С.А.

**ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО СКОРОСТИ РОСТА КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *Mycobacterium tuberculosis*:
ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ, ЛОКАЛИЗАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ЛЕЧЕНИЯ** 175

Елисеева В.С., Кругляк С.П., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Боровская Н.А.

ДИНАМИКА IL-2 У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ С УЧЕТОМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ 187

Зарубаев В.В., Васильева С.В., Есаулкова Я.Л., Гаршинина А.В., Вепринцева В.М., Галочкина А.В., Процак Е.С., Теселкин И.В.,
Морковник А.С., Диваева Л.Н., Лаврентьева И.Н.

**ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ** 195

Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д.

**РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ МОНОЦИТОВ КРОВИ НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛОЦИТАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
И СОСТОЯНИЕ ИХ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ** 201

Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Головин А.С., Лебедева А.М., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С.

**РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ ПИОГЕННОГО СТРЕПТОКОККА В ПОДАВЛЕНИИ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА (NO)
МАКРОФАГАМИ** 211

Краткие сообщения

Панферова Ю.А., Суворова М.А., Шапарь А.О., Токаревич Н.К.

**БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПАТОГЕНЫ В КЛЕЩАХ *Ixodes sp.* НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА
И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ** 219

Филатова Е.Н., Солнцев Л.А., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВГЧ-6-ОПОСРЕДОВАННОГО
ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА** 223

Бичурин М.А., Железнова Н.В., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Куляшова Л.Б., Тотолян Арег А.

**РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ IgM-КОРЬ АНТИТЕЛ
В РАЗНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОНАХ** 230

Левкова Е.А., Савин С.З., Емельянова Э.Б., Смиренина И.В.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИНФЕКЦИОННЫЕ МАРКЕРЫ БЕСПЛОДИЯ 235

Правила для авторов 241

Авторский указатель 244

Предметный указатель 244

CONTENTS

Reviews

Shpynov S.N., Pozdnichenko N.N., Gumenyuk A.S., Skiba A.A.

GENOMOSYSTEMATICS OF RICKETTSIAE 107

Shen X.-F., Guan W.-X., Du J.-F., Puzyryova L.V.

DISTURBANCE OF AN APOPTOSIS OF NEUTROPHILS AT A SEPSIS 119

Pasechnik O.A., Blokh A.I.

**THE PREVALENCE OF HIV RECOMBINANT FORMS IN RUSSIA AND COUNTRIES OF THE CIS:
SYSTEMATIC REVIEW AND METAANALYSIS** 127

Boeva E.V., Belyakov N.A.

IMMUNE RECONSTITUTION INFLAMMATORY SYNDROME IN HIV INFECTION 139

Original articles

Matveeva L.V., Kapkaeva R.C., Chudajkin A.N., Mishanina L.S.

**CHANGES MONOCYTE CHEMOATTRACTANTS PROTEIN-1 IN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED
GASTRODUODENAL DISEASES** 150

Kolenchukova O.A., Gvozdev I.N., Gorbachova N.N., Litvinova I.S.

**OXYGEN-DEPENDENT PHAGOCYTOSIS OF BLOOD MONOCYTES IN CHILDREN WITH *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED
GASTRIC AND DUODENAL EROSIONS AND ULCER** 157

Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Makarova M.A., Egorova S.A., Zabrovskaia A.V., Suzhaeva L.V., Zueva E.V., Kaftyreva L.A.

**DIFFICULTIES IN IDENTIFICATION OF *COMAMONAS KERSTERSII* STRAINS ISOLATED FROM
INTESTINAL MICROBIOTA OF RESIDENTS OF REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIAN FEDERATION** 164

Rubakova E.I., Kapina M.A., Logunova N.N., Majorov K.B., Apt A.S.

**REGULATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY THE POPULATION
OF REGULATORY DENDRITIC CELLS** 169

Manicheva O.A., Dogonadze M.Z., Melnikova N.N., Vishnevskiy B.I., Manichev S.A.

**THE GROWTH RATE PHENOTYPIC PROPERTY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL STRAINS:
DEPENDENCE ON TUBERCULOSIS LOCALIZATION, TREATMENT, DRUG SUSCEPTIBILITY** 175

Eliseeva V.S., Kruglak S.P., Sklar L.F., Markelova E.V., Borovskaya N.A.

DYNAMICS OF IL-2 PLASMA LEVELS IN HIV PATIENTS WITH CONSIDERING DRUGS RESISTANCE 187

*Zarubaev V.V., Vasilieva S.V., Esaulkova Y.L., Garshinina A.V., Veprintseva V.M., Galochkina A.V., Protsak Y.S., Teselkin I.V.,
Morkovnik A.S., Divaeva L.N., Lavrentieva I.N.*

PROTECTIVE ACTIVITY OF NOVEL BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES AT EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION 195

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavcev I.V., Belenyuk V.D.

**REGULATORY INFLUENCE OF BLOOD MONOCYTES ON THE POPULATION COMPOSITION OF GRANULOCYTES
AND THE STATE OF THEIR RESPIRATORY BURST IN THE WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS** 201

Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Golovin A.S., Lebedeva A.M., Vasilyev V.B., Freidlin I.S.

**THE ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* IN INHIBITION MACROPHAGES
NITROGEN MONOXIDE (NO) SYNTHESIS** 211

Short communications

Panferova Yu.A., Suvorova M.A., Shapar' A.O., Tokarevich N.K.

BACTERIAL AND VIRAL PATHOGENS IN *IXODES* SP. TICKS IN ST. PETERSBURG AND LENINGRAD DISTRICT 219

Filatova E.N., Solntsev L.A., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V.

**DETERMINATION OF SOME IMMUNOLOGICAL FEATURES OF HHV-6-MEDIATED INFECTIOUS MONONUCLEOSIS
IN CHILDREN BY THE METHOD OF DISCRIMINATORY ANALYSIS** 223

Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Kulyashova L.B., Totolian Areg A.

**STUDY OF ELISA TEST-SYSTEMS OF DIFFERENT FORMATS FOR DETECTION OF MEASLES VIRUS SPECIFIC IgM
IN DIFFERENT GEOGRAPHIC ZONES** 230

Levkova E.A., Savin S.Z., Emelyanova E.B., Smirenina I.V.

GENETIC AND INFECTIOUS MARKERS OF INFERTILITY 235

Instructions to Authors 241

Author index 244

Subject index 244

ГЕНОСИСТЕМАТИКА РИККЕТСИЙ

С.Н. Шпынов¹, Н.Н. Поздниченко², А.С. Гуменюк², А.А. Скиба²

¹ ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия

² Омский государственный технический университет, г. Омск, Россия

Резюме. Определение термина «геном» было дано немецким ученым-ботаником Г. Винклером почти сто лет назад, в 1920 году. Недавно было представлено определение генома для бактерий (риккетсий) с одной хромосомой с позиции теории информации, биологии и биоинформатики как информационной цепи нуклеотидов. Систематика риккетсий, являющихся облигатными внутриклеточными микроорганизмами, основана на ограниченном количестве фенотипических признаков. Классификации, построенные при анализе генов, фрагментов геномов и их конкатенаций вызывают дискуссии. Применение разработанного аппарата формального анализа строя (<http://foarlab.org>) при изучении полноразмерных геномов позволило представить систематику риккетсий и *Orientia tsutsugamushi* из семейства *Rickettsiaceae*. Использование этого подхода подтвердило существование групп сыпного тифа, клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и «предковой» группы внутри рода *Rickettsia* и позволило выделить внутри этого рода группу *Rickettsia felis*, располагающуюся между «предковой» группой и группой КПЛ, и группу *R. akari* на границе между группой КПЛ и родом *Orientia*. Разработка инструментов формального анализа строя — «Карта генов» и «Матрица сходства» — помогла провести углубленное изучение полноразмерных геномов риккетсий с учетом характеристик их генов и некодирующих последовательностей. Применение данных инструментов позволило подтвердить с помощью полученной классификации представление об экологических особенностях риккетсий, структуре нозологических форм и эпидемиологических закономерностях риккетсиозов, а также оценить вирулентность штаммов двух наиболее патогенных видов риккетсий — *R. prowazekii* и *R. rickettsii*. В данной работе впервые удалось осуществить целостное, согласованное и многоаспектное рассмотрение совокупности близкородственных бактерий (семейства бактерий) и связанных с ними проявлений. В основу разработанного и описанного здесь системного подхода к изучению бактерий положена новая математическая модель — расположение нуклеотидов в полноразмерном геноме и его чувствительные однозначные числовые характеристики. Предложенный методологический подход назван «геномсистематика» и основывается на математическом моделировании полноразмерных геномов риккетсий (бактерий) с помощью средств формального анализа строя. Классификация риккетсий и риккетсиозов, полученная с помощью этого подхода, соответствует экологическим, эпидемиологическим и этиологическим принципам. Применение геномсистематики может послужить выполнению задач и целей профилактической медицины. Публикация является завершением этапа серии научных исследований по разработке методологии комплексного подхода, основанного на применении новых средств математического моделирования при изучении объектов и закономерностей естественнонаучных дисциплин биологического и медицинского профиля.

Ключевые слова: риккетсии, риккетсиозы, систематика, экология, эпидемиология, вирулентность, геном, формальный анализ строя, геномсистематика.

Адрес для переписки:

Шпынов Станислав Николаевич
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18, ФГБУ ФНИЦ
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (499) 193-61-85 (служебн.).
E-mail: stan63@inbox.ru

Contacts:

Stanislav N. Shpynov
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology.
Phone/fax: +7 (499) 193-61-85 (office).
E-mail: stan63@inbox.ru

Библиографическое описание:

Шпынов С.Н., Поздниченко Н.Н., Гуменюк А.С., Скиба А.А.
Геномсистематика риккетсий // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2.
С. 107–118. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-107-118

Citation:

Shpynov S.N., Pozdnicenko N.N., Gumenyuk A.S., Skiba A.A.
Genomosystematics of rickettsiae // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 107–118.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-107-118

GENOMOSYSTEMATICS OF RICKETTSIAE

Shpynov S.N.^a, Pozdnichenko N.N.^b, Gumenyuk A.S.^b, Skiba A.A.^b

^a N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Omsk State Technical University, Omsk, Russian Federation

Abstract. The definition of the term genome was given by the German botanist G. Winkler almost one hundred years ago in 1920. A genome definition for bacterial (rickettsia) with a single chromosome was recently presented from the perspective of information theory, biology and bioinformatics as the information chain of nucleotides. The systematics of rickettsiae (obligate intracellular microorganisms) is based on a limited number of phenotypic characters. Classifications built on the analysis of genes, fragments of genomes and their concatenations cause discussion. Application of the Formal Order Analysis (FOA, <http://foarlab.org>) in the study of complete genomes allowed to submit the systematics of representatives of the family *Rickettsiaceae*. This approach confirmed the existence of typhus group (TG), spotted fever group (SFG), and an «ancestral» group within the genus *Rickettsia*, and allowed the isolation of the *Rickettsia felis* group within this genus, located between the «ancestral» group and the SFG and the *R. akari* group on the border between the SFG group and the genus *Orientia*. The development of the tools of FOA — «Map of Genes» and «Matrix of Similarity» — helped to conduct an in-depth study of the complete genomes of rickettsia, taking into account the characteristics of their genes and non-coding sequences. Application of these instruments, with the help of the obtained classification, confirmed the notion of ecological features of rickettsia, the structure of nosological forms and the epidemiological patterns of rickettsiosis, and made it possible to assess the virulence of the strains of the two most pathogenic species of rickettsia, *R. prowazekii* and *R. rickettsia*. In this work, for the first time, a holistic, consistent and multidimensional observation of a set of closely related bacteria (a family of bacteria) and the manifestations associated with them was carried out. The basis of the developed and herein described systematic approach to the study of bacteria is a new mathematical model — the arrangement of nucleotides in a complete genome and its sensitive unambiguous numerical characteristics. A new methodological approach named genomosystematics and based on mathematical modeling of complete genomes of rickettsiae (bacteria) using FOA. Classification of rickettsiae and rickettsioses obtained with the help of this approach corresponds to ecological, epidemiological and etiological principles. Application of the genomosystematics can serve the goals and objectives of preventive medicine. The publication completes a series of scientific works presenting the methodology of an integrated approach based on the application of mathematical analysis tools in the study of objects and laws of natural science disciplines of biological and medical profile.

Key words: *rickettsiae*, *rickettsioses*, *systematics*, *ecology*, *epidemiology*, *virulence*, *genome*, *formal order analysis*, *genomosystematics*.

Введение

Риккетсии (представители рода *Rickettsia*) — облигатные внутриклеточные бактерии, передающиеся членистоногими, которые могут вызывать у человека риккетсиозы — лихорадочные заболевания, от легкой степени тяжести до летального исхода, характеризующиеся сыпью [41]. В настоящее время 29 видов риккетсий имеют валидные названия, из них 20 видов являются патогенными [45], включая этиологические агенты эпидемического сыпного тифа (ЭСТ) — *Rickettsia prowazekii* и пятнистой лихорадки Скалистых гор (ПЛСГ) — *R. rickettsii*. Систематика и номенклатура риккетсий основана на ограниченном количестве фенотипических характеристик, связанных с облигатной внутриклеточной локализацией.

Исторически на основании фенотипических характеристик представители рода *Rickettsia* были классифицированы на группы: I) клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ); II) сыпного тифа (СТ) и III) группу кустарникового тифа (КТ), с единственным представителем — *R. tsutsugamushi* [40, 59]. Применение молекулярно-биологического анализа гена 16S рРНК рик-

кетсий подтвердило наличие групп СТ, КПЛ и позволило выделить «предковую» группу в роде *Rickettsia* [55], однако *R. tsutsugamushi* была реклассифицирована как *Orientia tsutsugamushi*, образовав новый род *Orientia* [56]. При изучении геномов риккетсий и плазмид было предложено создать «переходную» группу в составе *R. felis* и *R. akari* [30].

Знание систематики риккетсий необходимо для выяснения их положения среди бактерий и представления о фенотипических и генотипических характеристиках, определяющих их экологию, эпидемиологию, диагностику и этиотропное лечение вызываемых ими заболеваний. Объективная систематика риккетсий должна базироваться на комплексном подходе, основанном на применении традиционных методов риккетсиологии, изучающих фенотипические характеристики, и прогрессивных молекулярно-биологических технологиях, подкрепленных методами биоинформационного анализа, дополненных подходами, учитывающими информацию, содержащуюся в полноразмерных геномах, и соответствовать экологическим, эпидемиологическим и этиологическим принципам.

Биоинформационные программы, включая BLAST [13], MEGA [37] основаны на математических и статистических методах сравнения только ортологичных генов, гомологичных фрагментов геномов или их конкатенаций и учитывают только локальные характеристики изучаемых объектов, но не являются результатом анализа и сравнения полноразмерных геномов риккетсий характеризующих весь комплекс их структурных и функциональных особенностей.

В целях создания новой, альтернативной модели для изучения генетического аппарата риккетсий, основанной на анализе первичной структуры ДНК, был разработан подход — формальный анализ строя (Formal Order Analysis — FOA), который преобразует расположение нуклеотидов в изучаемой последовательности произвольной длины в числовую последовательность фиксированной длины с учетом оригинального расположения нуклеотидов в полноразмерном геноме [3]. Для углубленного изучения структуры геномов (хромосом и плазмид) были разработаны инструменты FOA карты генов [5] и матрица сходства [4].

В результате проведения серии исследований была получена систематика представителей семейства *Rickettsiaceae*, основанная на анализе полноразмерных геномов, что подтвердило существование трех групп в роде *Rickettsia*: СТ, КПЛ, «предковой», и позволило выделить группы *R. felis* и *R. akari*, исключая возможность образования «переходной» группы [50]. Там же было дано определение генома с позиции теории информации, биологии и биоинформатики как информационной цепи нуклеотидов.

Фундаментальный аспект выполненных работ был направлен на разработку нового методологического подхода — геномосистематики риккетсий, основанного на применении инструментов FOA, для получения и анализа информации содержащейся в кодирующих и не кодирующих регионах полноразмерных геномов для построения систематики риккетсий, отражающей их экологические особенности, эпидемиологические и нозологические аспекты вызываемых ими заболеваний. Это особенно актуально в прикладном значении для классификации некультивируемых в лабораторных условиях видов, анализа вирулентности штаммов патогенных видов риккетсий и компактного представления информации, содержащейся в генетических текстах полноразмерных геномов.

Числовые характеристики строя цепи

Применение числовой характеристики FOA — средней удаленности — позволяет произвести значительное сокращение объема ин-

формации, содержащейся в геномах риккетсий, депонированных в Genbank. Например, референсный геном *R. prowazekii* NMRC Madrid E (NCBI: NC_020992) в формате FASTA состоит из 1 111 520 символов нуклеотидов, а содержащаяся в нем информация представлена 1 111 520 байтами. Эта информация может быть отображена на 249 страницах формата А4 содержащих по 4480 символов нуклеотидов. При перекодировке с помощью инструментария FOA эта информация может быть редуцирована и представлена всего 8 байтами (одним числом, имеющим 14 знаков после запятой: 1,41848807421873), что позволяет сократить объем информации в 138 940 раз.

Этот инструмент может найти применение в качестве технологии для эффективного уменьшения объема информации в массивах данных, хранения ее в таком виде в базах данных (Genbank) и идентификации генетических текстов.

Систематика представителей семейства *Rickettsiaceae*

В данной работе представлена верификация классификации прокариот из семейства *Rickettsiaceae* [49, 50], построенная на основании сравнения показателей одной характеристики строя — средней удаленности нуклеотидов в полноразмерных геномах, с учетом таксономии их хозяев — членистоногих (*Arthropoda*), классификации вызываемых ими нозологических форм и особенностей механизма передачи этиологических агентов при эпидемиологических проявлениях (рис.).

Полученная классификация продемонстрировала значительную дивергенцию родов *Rickettsia* и *Orientia* в семействе *Rickettsiaceae* (рис.) [49]. Род *Rickettsia* образован двумя надгруппами: СТ и КПЛ. Надгруппа СТ включает в себя группу СТ (*R. prowazekii* и *R. typhi*) и «предковую» группу, состоящую из двух подгрупп: *R. bellii* (*Rickettsiales bacterium* и *R. bellii*) и подгруппу *R. canadensis* (*R. canadensis* и *R. monacensis*). Образование надгруппы СТ может быть объяснено перекрестными серологическими реакциями между антигенами *R. canadensis* и риккетсиями группы СТ [7, 38]. Положение *R. monacensis* рядом с *R. canadensis* McKiel из «предковой» группы может быть связано с расположением на периферии группы КПЛ вместе с другими изолятами ассоциированными с видом клещей *Ixodes ricinus* [33]. Часть кандидатов в новые виды риккетсий, экологически связанных с клещами из рода *Ixodes*, недавно генотипированных в Старом и Новом Свете, имеют наибольшую филогенетическую близость с *R. canadensis* [15]. После

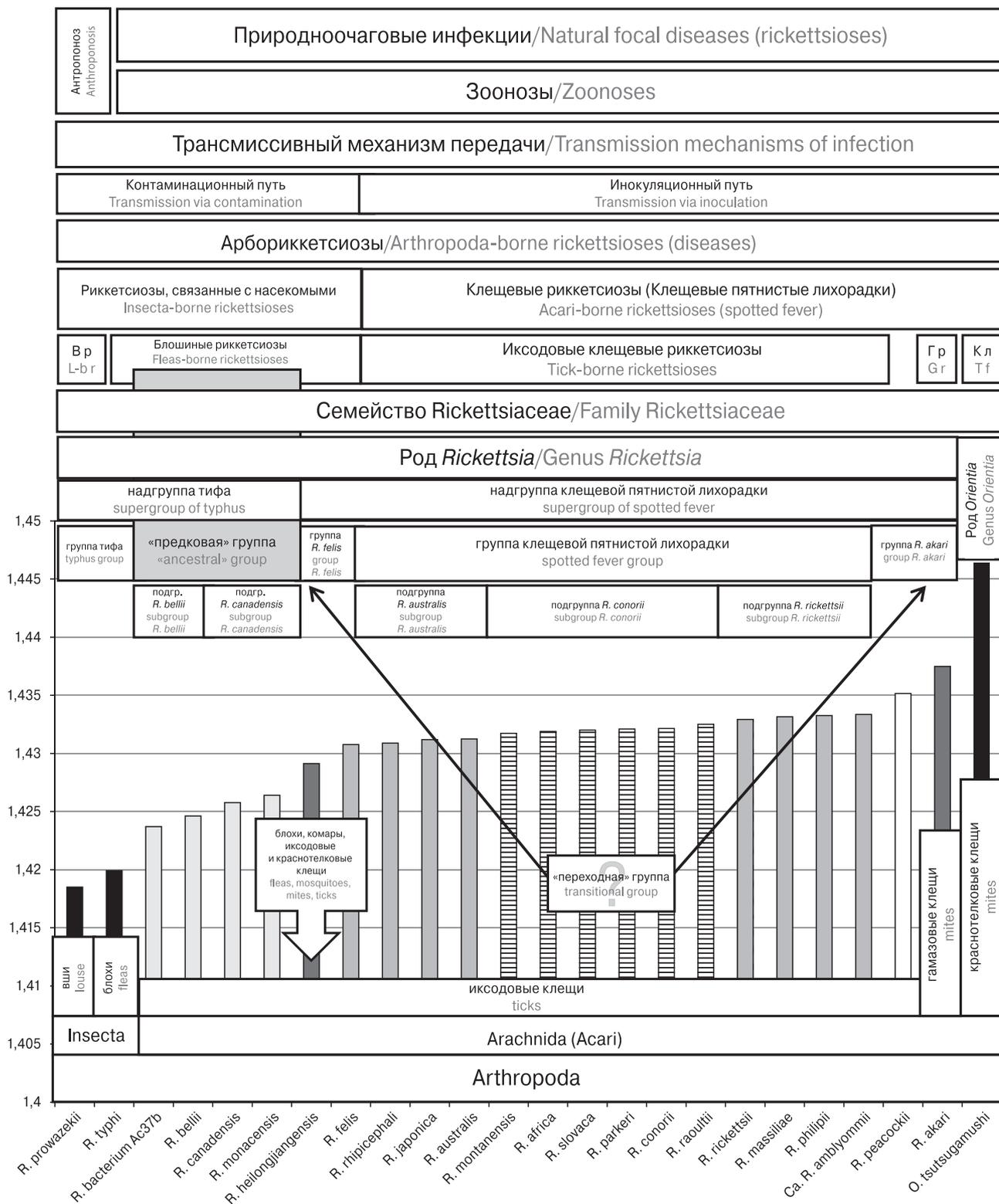


Рисунок. Систематика риккетсий и *O. tsutsugamushi*, построенная на основании анализа характеристики FOA средней удаленности — *g* (геномосистематика риккетсий)

Figure. The systematics of rickettsiae and *O. tsutsugamushi*, based on analyses of characteristics of FOA an average remoteness — *g* (genomosystematics of rickettsiae)

По оси абсцисс расположены геномы риккетсий, а по оси ординат — характеристика средней удаленности.

В р — вшивый риккетсиоз; Г р — гамазовый (клещевой) риккетсиоз; К л — краснотелковая (клещевая) лихорадка.

Genomes of rickettsiae are located along the X-axis, and their average remoteness characteristic values are located on the Y-axis. L-b r — Louse-borne rickettsiosis; G r — gamasid (mite) rickettsiosis; T f — chiggers-borne (tsutsugamushi) fever.

формирования надгруппы КПЛ в ней сначала произошла дивергенция группы *R. akari*, с последующим разделением на группы *R. felis* [50] и КПЛ. В группе КПЛ первоначально произошло выделение подгруппы *R. rickettsii* (*R. massiliae*, *R. philipii* и *R. amblyommatidis*), представители которой выявлены преимущественно в Северной и Центральной Америке в иксодовых клещах (рода *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* и *Haemaphysalis*). Позже произошла дивергенция на подгруппы *R. conorii* (*R. raoultii*, *R. montanensis*, *R. africa*, *R. slovaca* и *R. parkeri*) и *R. australis* (*R. heilongjiangensis*, *R. rhipicephali* и *R. japonica*). Представители подгруппы *R. conorii* выявлены на всех континентах, кроме Австралии (Европа, Азия, Северная Африка, острова Тихого океана, Северная и Центральная Америка) в иксодовых клещах (рода *Dermacentor*, *Rhipicephalus* и *Amblyomma*). Виды риккетсий из подгруппы *R. australis* имеют распространение преимущественно в Азиатско-Австралийском регионе (рода *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* и *Ixodes*). Группа *R. akari* была сформирована на границе между группой КПЛ и родом *Orientia*, что соответствует таксономическому положению их хозяев (Arachnida: Acari) [11]. Позицию апатогенного вида *R. peacockii* по соседству с *R. akari* можно объяснить отсутствием синтении с геномом близкородственного патогенного вида *R. rickettsii* вследствие больших геномных реорганизаций, в результате приведших к потере вирулентности [27, 51]. Геномы двух штаммов *O. tsutsugamushi* продемонстрировали выраженную дивергенцию в отношении представителей рода *Rickettsia*, что поддерживает формирование отдельного рода *Orientia* внутри семейства *Rickettsiaceae* [56].

Представленная систематика не противоречит филогенетической конструкции основанной на анализе конкатенации 640 общих генов риккетсий, показавшей что первоначально произошло формирование «предковой» группы и СТ, затем произошла дивергенция двух видов *R. akari* и *R. felis* от остальных представителей группы КПЛ [29]. Также систематика показала большое сходство с филодендрограммой, построенной на основании изучения гена 16S рРНК риккетсий [28], за исключением позиции *R. akari*, которая по нашим данным расположилась ближе к *O. tsutsugamushi*.

Экологические аспекты геномосистематики

Риккетсии и *O. tsutsugamushi* являются этиологическими агентами различных нозологических форм риккетсиозов и лихорадки цуцугамуши, которые имеют разные эколого-эпидемио-

логические и клинические особенности (хозяин, механизм передачи, сезонные проявления, клиническая картина и т. д.). Классификация представителей семейства *Rickettsiaceae* продемонстрировала тесную экологическую связь между патогенными видами (группами) риккетсий с различными таксонами членистоногих, в высокой степени коррелирующей с их таксономическим положением.

Расположение видов риккетсий и формирование групп были осуществлены в соответствии с показателем характеристики средней удаленности (*g*) [49]. Риккетсии, экологически связанные с насекомыми (вши, блохи), образовали группу СТ (*g* = 1,418232–1,419908) отдельную от видов риккетсий из «предковой» группы (*g* = 1,424610–1,425761) и группы КПЛ (*g* = 1,431179–1,435146), связанных с иксодовыми клещами (рис.). *R. akari* (*g* = 1,437473), экологически связанная с гамазовыми клещами, расположилась на границе между группой КПЛ и *O. tsutsugamushi* (*g* = 1,445994–1,446423) из рода *Orientia*, которая связана с краснотелковыми клещами. В связи с этим *R. akari* была выделена в отдельную группу в пределах рода *Rickettsia* на основании характеристики средней удаленности нуклеотидов в геноме и таксономического положения хозяев — гамазовых клещей. В соответствии с полученными данными, показатель *g*, подсчитанный для *R. felis* (*g* = 1,429118), значительно отличался от такового для *R. akari*. Применение показателя *g* как ранжирующего (а здесь и классифицирующего) параметра позволило поместить *R. felis* между «предковой» группой и КПЛ, в то время как *R. akari* была помещена между группой КПЛ и родом *Orientia*. Таким образом, результаты нашего анализа не поддерживают создание «переходной» группы [30] в составе *R. felis* и *R. akari* (рис.). В то же время наше представление не противоречит существующим [28, 29, 41], так как по сути демонстрирует только то, что *R. felis* и *R. akari* раньше отделились от группы КПЛ, но при этом дополнительно информирует, что их дивергенция происходила в разных направлениях, исходя из существующих экологических условий: у *R. felis* в сторону группы СТ, а у *R. akari* в направлении *O. tsutsugamushi*. Это демонстрирует ограниченность интерпретации результатов, полученных с помощью применяемых филогенетических программ. Размер генома *R. felis* является большим, чем у всех других *Rickettsia* spp., включая *R. akari*, за исключением *R. bellii*, и, видимо, *R. felis* ближе к «предковой» группе, а не является эволюционным шагом между группой КПЛ и СТ [41]. Хозяином *R. felis* считался только представитель класса насекомых — кошачья блоха (*Ctenocephalides felis*).

Недавно этот вид риккетсий был генотипирован в различных членистоногих из классов *Insecta* (блохи, комары) [41, 54] и *Arachnida* (иксодовые и краснотелковые клещи) [12, 21, 32, 44, 52]. *Candidatus R. senegalensis* была недавно выявлена в *C. felis* и образовала компактный изолированный клад с видами *R. felis* и *R. hoogstraalii* [39]. *Candidatus R. asemboensis* была недавно определена, как близкая к *R. felis* [34]. Таким образом, можно считать, что *R. felis* вместе с *Candidatus R. senegalensis* и *Candidatus R. asemboensis* представляют собой отдельную группу и филогенетическую линию внутри рода *Rickettsia*, экологически связанную с кошачьей блохой [50]. *R. felis* была выявлена у более чем 20 различных видов-гематофагов: блох, иксодовых, краснотелковых клещей и комаров в разных регионах планеты [14]. Этот вид на основании изучения структуры геномов отнесен к наиболее древним видам риккетсий [9]. Уникальность *R. felis* обусловленная экологической связью с представителями обоих классов членистоногих подтверждает ее обособленное положение по отношению к другим видам и выделение в классификации в самостоятельную группу.

В соответствии с полученными данными, представители родов *Rickettsia* и *Orientia* из семейства *Rickettsiaceae* были сгруппированы [49] и продемонстрировали экологические связи с представителями класса *Insecta* (вши, блохи) и подкласса *Acari* (иксодовые, гамазовые и краснотелковые клещи) класса *Arachnida* типа членистоногих (*Arthropoda*). Вши и блохи из класса *Insecta* являются хозяевами видов риккетсий из группы СТ (*R. prowazekii* и *R. typhi*) и *R. felis*. Платяная вошь (*Pediculus hominis corporis*) является основным резервуаром и переносчиком *R. prowazekii*. *C. felis* и другие виды блох являются переносчиками *R. typhi* и *R. felis*. Подкласс *Acari* класса *Arachnida* включает надотряды *Parasitiformes* и *Acariformes* [36]. Риккетсии «предковой» группы, группы КПЛ, *R. akari* и *O. tsutsugamushi* экологически связаны с представителями надотрядов *Parasitiformes* и *Acariformes*. Иксодовые клещи семейства *Ixodidae* (рода *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* и *Ixodes*) надсемейства *Ixodoidea* отряда *Ixodida* надотряда *Parasitiformes* являются хозяевами риккетсий «предковой» группы и группы КПЛ, а гамазовые клещи из отряда *Mesostigmata* являются хозяевами *R. akari*. Краснотелковые клещи (тромбикулиды) отряда *Trombidiformes* надотряда *Acariformes* [36] служат переносчиками и хозяевами *O. tsutsugamushi*.

R. felis заняла центральную позицию в полученной классификационной схеме, что, по видимому, связано с ее высокой экологичес-

кой пластичностью, проявляющейся связями с представителями членистоногих как класса *Insecta* (вши, блохи, книжная вошь, комары), так и *Arachnida* (иксодовые, гамазовые и краснотелковые клещи). Другие виды риккетсий и *O. tsutsugamushi* проявляют более узкую специализацию в отношении своих хозяев — клещей.

Систематика риккетсий была верифицирована на основании выраженной экологической связи между представителями каждой группы риккетсий с разными таксонами *Arthropoda* (рис.). Членистоногие из класса *Insecta* являются хозяевами *R. prowazekii* (платяная вошь) и *R. typhi* (блохи) из группы СТ. Членистоногие из класса *Arachnida* служат хозяевами для видов риккетсий из «предковой» группы (иксодовые клещи), группы КПЛ (иксодовые клещи), группы *R. akari* (гамазовые клещи) и единственного представителя рода *Orientia* — *O. tsutsugamushi* (краснотелковые клещи). Членистоногие (блохи, комары, иксодовые и краснотелковые клещи) из обоих классов являются хозяевами *R. felis* из одноименной группы.

Этиологические и нозологические аспекты геномосистематики

В соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра (МКБ-10) раздел «Риккетсиозы» (A75-A79) представлен следующими нозологическими формами: A75.0 Эпидемический вшивый тиф, вызываемый *R. prowazekii*; A75.1 Рецидивирующий тиф [болезнь Брилла]; A75.2 Тиф, вызываемый *R. typhi*; A75.3 Тиф, вызываемый *R. tsutsugamushi*; A77 Пятнистая лихорадка (ПЛ) [клещевые риккетсиозы]: A77.0 ПЛ, вызываемая *R. rickettsii*; A77.1 ПЛ, вызываемая *R. conorii*; A77.2 ПЛ, вызываемая *R. siberica*; A77.3 ПЛ, вызываемая *R. australis*; A77.8 Другие ПЛ.

Систематика представителей семейства *Rickettsiaceae*, полученная на основе применения ФОА, продемонстрировала высокую степень сходства с классификацией риккетсий и риккетсиозов, полученной П.Ф. Здродовским и Е.М. Голиневич на основе комплексной характеристики этой группы инфекций [6]: I. Группа вшиво-блошиного сыпного тифа (группа сыпного тифа): 1. Эпидемический (вшивый сыпной тиф) — *R. prowazeki*; 2. Эндемический (крысиный) сыпной тиф — *R. typhi* (*R. mooseri*). II. Группа клещевой пятнистой лихорадки: а) подгруппа Нового Света: 1. Пятнистая лихорадка Скалистых гор — *R. rickettsii*; 2. Сыпной тиф Сан-Пауло — *R. rickettsii*; б) подгруппа Старого Света: 1. Марсельская (средиземноморская) лихорадка

ка — *R. conorii*; 2. Клещевой риккетсиоз (клещевой сыпной тиф Северной Азии — КСТСА) — *R. sibirica*; 3. Североавстралийский клещевой сыпной тиф — *D. rickettsi* var (?); в) подгруппа гамазовых риккетсиозов: 1. Осповидный, или везикулезный, риккетсиоз, возбудитель — *R. akari*. III. Группа краснотелково-клещевой лихорадки (цуцугамуши): 1. Лихорадка цуцугамуши (японская речная лихорадка) — *R. orientalis*.

В МКБ-10 и классификации риккетсий и риккетсиозов по П.Ф. Здродовскому и Е.М. Голинович [6] в названиях нозологических форм риккетсиозов, как правило, отражены названия членистоногих-переносчиков с которыми связана их эпидемиология. Если применить этот принцип по отношению к нозологическим формам риккетсиозов, то их можно систематизировать в соответствии с полученной классификацией (рис.).

Этиологические агенты риккетсиозов и лихорадки цуцугамуши экологически связаны с членистоногими (*Arthropoda*) и вызывают группу заболеваний, которые могут быть объединены по эколого-эпидемиологическому принципу в название арбориккетсиозы (арбо — arbo, от лат. arthropoda — членистоногие и англ. borne — передающийся, происходящий). Эту большую группу заболеваний можно подразделить на две группы (рис.): заболевания, возбудители которых передаются через насекомых — риккетсиозы, ассоциированные с насекомыми (insecta-borne rickettsioses), и заболевания, возбудители которых передаются через клещей — клещевые риккетсиозы (acariborne rickettsioses). К группе риккетсиозов, ассоциированных с насекомыми, относятся: 1) вшивый (эпидемический сыпной тиф, вызываемый *R. prowazekii*) и 2) блошинные риккетсиозы (эндемический, или крысиный, сыпной тиф, вызываемый *R. typhi* и риккетсиоз, вызываемый *R. felis*). К группе клещевых риккетсиозов относятся: 3) иксодовые (клещевые) риккетсиозы (ПЛСГ — *R. rickettsii*, средиземноморская пятнистая лихорадка — *R. conorii*, КСТСА или сибирский клещевой тиф — *R. sibirica*, Квинслендский клещевой тиф — *R. australis* и др.); 4) гамазовый (клещевой) риккетсиоз, вызываемый *R. akari*. Также к этой группе можно отнести: 5) краснотелковую (клещевую) лихорадку — лихорадку цуцугамуши, вызываемую *O. tsutsugamushi*.

Таким образом, систематика риккетсий, основанная на анализе полноразмерных геномов, подтверждает формирование групп нозологических форм риккетсиозов (рис.), сформированных в соответствии с классификацией этиологических агентов (риккетсий и *O. tsutsugamushi*).

Эпидемиологические и эпизоотологические аспекты геномосистематики

Считается, что, в отличие от других риккетсиозов, ЭСТ, очевидно, не имеет резервуара возбудителя в природе, но, распространяясь через вшей от человека к человеку (антропоноз), при завшивленности населения и соответствующих условиях может вызывать эпидемии и пандемии [6]. Факт описания в США редкого, потенциально опасного для жизни человека зоонозного заболевания, напоминающего ЭСТ и связанного с белками летягами [46], может расширить наше представление об эпидемиологии инфекции, вызываемой *R. prowazekii*. Сибирский клещевой тиф, гамазовый риккетсиоз и краснотелковый сыпной тиф (лихорадка цуцугамуши) являются трансмиссивными зоонозами с природной очаговостью [6, 10].

С позиции эпидемиологии специфическая локализация возбудителей заразных болезней в организме, соответствующий ей механизм передачи и определяемая ими сумма основных биологических свойств возбудителя представляют собой комплексный объективный признак, который может быть положен в основу рациональной классификации инфекционных болезней человека [2]. При риккетсиозах и лихорадке цуцугамуши осуществляется трансмиссивный механизм передачи через эктопаразитов-членистоногих (рис.), который может быть реализован двумя путями передачи возбудителя: контаминационным — возбудитель выделяется с фекалиями переносчика, и инокуляционным, когда возбудитель вводится со слюной переносчика при кровососании. Факторами передачи являются фекалии и слюна членистоногих: насекомых и клещей соответственно.

При ЭСТ источником возбудителя инфекции является больной человек. Переносчик *R. prowazekii* — платяная вошь (*P. hominis corporis*) является ее основным резервуаром [59], которая сама погибает от инфекции. В триаде «источник инфекции — переносчик — неиммунное население», получившей наименование «сыпнотифозный» потенциал [60], наибольшее эпидемиологическое значение отводится как источнику, так и переносчику, без которого эпидемический процесс не осуществляется. Механизм передачи *R. prowazekii* — трансмиссивный (возможен аэрогенный), путь передачи — через контаминацию ранки при кровососании (укусе) вши, фактор передачи — фекалии инфицированной вши. Таким образом, передача риккетсий происходит не сразу через укус, а вследствие контаминации (заражения) при контакте — втирании в место укуса фекалий

или раздавленных тел инфицированных вшей [18]. Подобный механизм имеет место и при зоонозах, ассоциированных с другими насекомыми — блохами, как при заражении *R. typhi* и *R. felis*, передаваемых *C. felis* [17, 22]. Передача *R. typhi* человеку может осуществляться путем контаминации кожи, возможно аспирационно через дыхательные пути в виде аэрозоли, содержащей инфекционный материал, или путем заражения конъюнктивы человека инфицированными фекалиями блох [47]. До недавнего времени считалось, что *C. felis* является единственным переносчиком *R. felis*, однако экспериментальные данные указывают на возможную роль комаров *Anopheles gambiae* в передаче этого вида риккетсий [24]. *R. felis* была выявлена в слюнных железах, кишечнике и яичниках *A. gambiae* [24], в эксперименте доказан путь передачи через укус насекомого с фактором передачи через слюну инфицированного насекомого (комара), а также аэрогенный механизм с вовлечением другого насекомого — книжной вши (*Liposcelis bostrychophila*) [14].

Таким образом, механизм передачи возбудителя при эпидемическом и эндемическом тифе, а также риккетсиозе, вызываемом *R. felis*, связан с контаминацией экскрементами (фактор передачи), содержащими риккетсии, инокулированных или травмированных кожных покровов человека и является трансмиссивным с контаминационным путем заражения (рис.).

Возбудители трансмиссивных инфекций с природной очаговостью, таких как эндемические риккетсиозы и лихорадка цуцугамуши [6, 10], циркулируют в природной экосистеме, включающей членистоногих-переносчиков, мелких и крупных диких или домашних животных и птиц, на которых они паразитируют [43, 48, 58]. Присутствие и персистенция риккетсий в клещах и блохах обеспечивается за счет процессов вертикальной и горизонтальной передачи [16, 53]. При вертикальной передаче риккетсии передаются трансвариально зараженной самкой, откладывающей зараженные яйца, и на следующих этапах развития при линьке зараженных ларв и нимф. В случае горизонтальной трансмиссии клещи и блохи заражаются риккетсиями при кормлении на животных с высоким уровнем риккетсиемии или при совместном кормлении зараженных и незараженных членистоногих на незараженном животном [61]. Заражение человека клещевыми риккетсиозами происходит случайным образом при кровососании зараженного клеща и не оказывает влияния на циркуляцию риккетсий в природном очаге.

Иксодовые клещи являются основными переносчиками и резервуаром риккетсий группы КПЛ [6, 10]. Заражение риккетсиями

происходит во время кровососания из слюнных желез клеща и, таким образом, они могут передаваться позвоночному хозяину, включая человека [1, 47]. *R. akari* вызывает везикулезный риккетсиоз, который регистрируется в населенных пунктах с вовлечением гамазовых клещей рода *Allodermanyssus* (*Liponyssoides*), домашних мышей (*Mus musculus*) и — случайно — человека [42]. Человек заражается *R. akari* в результате присасывания инфицированного клеща, а не от мышей. *O. tsutsugamushi* передается во время питания личинок краснотелковых клещей (*Leptotrombidium deliense*), которые являются резервуаром возбудителя и только на этой фазе жизненного цикла питаются на позвоночном хозяине [57]. Механизм передачи возбудителя при риккетсиозах группы КПЛ (включая везикулезный риккетсиоз) и лихорадке цуцугамуши осуществляется путем инокуляции во время кровососания членистоногого и является трансмиссивным с инокуляционным путем заражения (рис.), фактор передачи — слюна клеща.

Таким образом, при риккетсиозах и лихорадке цуцугамуши реализуется общий трансмиссивный механизм передачи возбудителя инфекции с принципиальным различием в путях и факторах передачи возбудителя при вшиво-блошиных и клещевых риккетсиозах. Источником возбудителя при вшивом риккетсиозе (антропоноз) является больной человек. При блошиных и клещевых риккетсиозах (зоонозы) источником возбудителя является прокормитель (резервуар), как правило, мелкое млекопитающее. Переносчиком служит членистоногое: при эпидемическом сыпном тифе — вошь, при эндемическом сыпном тифе и риккетсиозе, вызываемом *R. felis*, — блоха, при клещевых риккетсиозах — иксодовые, гамазовые и краснотелковые клещи.

Оценки степени вирулентности штаммов *R. prowazekii* и *R. rickettsii*

Матрица сходства [4] была использована для углубленного анализа геномов штаммов двух патогенных видов риккетсий, характеризующихся широким спектром степени вирулентности: *R. prowazekii* (10 штаммов) из группы СТ и *R. rickettsii* (11 штаммов) из группы КПЛ [49]. Геномы штаммов были ранжированы в пределах этих видов риккетсий в соответствии с уменьшением значения меры сходства по отношению к штаммам *R. prowazekii* Breinl и *R. rickettsii* Sheila Smith, характеризующимся наибольшей степенью вирулентности.

Штаммы *R. prowazekii* расположились в соответствии с убыванием процента компонентов геномов имеющих полную гомологию: Breinl

(100%) > Chernikova (85,7%) > Naples (80,37%) > Rp22 (80,11%) > BuV67-CWPP (74,42%) > Katsinyan (73,9%) > NMRC Madrid E (64,55%) > Madrid E (60,08%) > RpGvF24 (52,31%) > GvV257 (50,88%). Штаммы *R. rickettsii* расположились в следующем порядке: Sheila Smith (100%) > R (98,75%) > Brazil (80,79%) > Colombia (79,23%) > Arizona (75,68%) > Hino (75,05%) > Morgan (75,01%) > Iowa (74,31%) > Iowa isolate Large Clone (63,32%) > Iowa isolate Small Clone (63,32%) > Hlp # 2 (26,22%) [49].

Полученные с помощью матрицы сходства результаты подтверждают существующее представление о степени вирулентности штаммов риккетсий, полученное на основании фенотипических и генотипических характеристик [19, 20, 23, 26, 49].

Методологический подход «Геномосистематика»

Одна из первых попыток сравнить геномы прокариот (бактерии и археи) была отражена в работе E. Koonin et al. в 1997 г. [35]. Термин «филогеномика» охватывает систематику, основанную на изучении генов и анализе эволюции семейств генов в геномах [29, 31]. Классификация риккетсий, основанная на изучении пяти генов [28], является по своей сути геномосистематикой.

Предлагаемый методологический подход «Геномосистематика» основан на анализе полноразмерных геномов, аннотаций геномов и их компонентов посредством применения инструментов ФОА. При этом нуклеотидные последовательности геномов рассматриваются только с точки зрения теории информации М. Мазура [8] и моделируются как информационные цепи [3]. В результате применения этого подхода была решена проблема «оцифровки» геномов, что поддерживает принципы нумерической (численной) таксономии, основывающейся

на использовании максимального количества сопоставляемых признаков и математическом учете степени соответствия.

Существующие разноаспектные методы и подходы к исследованию бактерий дают преимущественно качественное их описание и нечеткие узкоаспектные, несогласованные систематики. В данной работе впервые удалось осуществить многоаспектное, согласованное и целостное рассмотрение совокупности близкородственных бактерий (семейства бактерий) и связанных с ними проявлений. В основу разработанного и описанного здесь системного подхода к изучению бактерий положена новая математическая модель — расположение нуклеотидов в полноразмерном геноме и его чувствительные однозначные числовые характеристики. Разработанные характеристики строя генома — это количественные меры, представляющие сложность геномов микроорганизмов, а также их сходство. Эти меры близки по свойствам математическим понятиям метрики (расстояния) и нормы (веса) для сложных объектов, что допускает принципиальную возможность их формального анализа.

Заключение

Новый подход назван геномосистематикой риккетсий и основывается на применении инструментов ФОА, экологических связях риккетсий с переносчиками-членистоногими, этиологии и эпидемиологии риккетсиозов. Применение этого методологического подхода позволяет осуществлять комплексную оценку генотипических и фенотипических характеристик для определения позиции изучаемого изолята в систематике риккетсий и прогнозировать его вирулентность. Применение геномосистематики может послужить выполнению задач и целей профилактической медицины.

Список литературы/References

1. Балашов Ю.С., Дайтер А.Б. Кровососущие членистоногие и риккетсии. Л.: Наука, 1973. 251 с. [Balashov Yu.S., Daiter A.B. Krovososushchie chlenistonogie i rikketsii [Blood-sucking arthropods and rickettsias]. *Leningrad: Nauka, 1973. 251 p.*]
2. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М.: Медицина, 1965. 290 с. [Gromashevskii L.V. Obshchaya epidemiologiya [General epidemiology]. *Moscow: Meditsina, 1965. 290 p.*]
3. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Родионов И.Н., Шпынов С.Н. О средствах формального анализа строя нуклеотидных цепей // Математическая биология и биоинформатика. 2013. Т. 8, № 1. С. 373–397. [Gumenyuk A.S., Postnichenko N.N., Rodionov I.N., Shpynov S.N. On the formal analysis of the building of nucleotide chains. *Matematicheskaya biologiya i bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics, 2013, vol. 8, no. 1, pp. 373–397. doi: 10.17537/2013.8.373 (In Russ.)*]
4. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Скиба А.А., Шпынов С.Н. Программа ЭВМ «Матрица сходства нуклеотидных последовательностей по их компонентам». Свидетельство о Государственной регистрации программы ЭВМ в Реестре программ ЭВМ № 2017616679 от 09.06.2017 г. [Gumenyuk A.S., Pozdnichenko N.N., Skiba A.A., Shpynov S.N. Computer Program «Matrix of similarity of nucleotide sequences by their components». Certificate of State Registration of the Computer Program in the Register of Computer Programs № 2017616679, 09.06.2017]
5. Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н., Скиба А.А., Шпынов С.Н. Программа ЭВМ «Карта генов». Свидетельство о Государственной регистрации программы ЭВМ в Реестре программ ЭВМ № 2017616730 от 13.06.2017 г. [Gumenyuk A.S.,

- Pozdnichenko N.N., Skiba A.A., Shpynov S.N. Computer Program «Map of genes». Certificate of State Registration of the Computer Program in the Register of Computer Programs No. 2017616730, 13.06.2017]
6. Здродовский П.Ф., Голиневич Е.М. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1972. 496 с. [Zdrodovskii P.F., Golinevich E.M. Uchenie o rikketsiyakh i rikketsiozakh. 3-e izd., pererab. i dop. [The doctrine of rickettsias and rickettsiosis. 3rd edition revised and enlarged]. Moscow: Medicina, 1972. 496 p.]
 7. Игнатович В.Ф. Антигенные связи риккетсий Провачека и риккетсий Канада, установленные при изучении сывороток больных болезнью Брилля // Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. 1977. Т. 21, № 1. С. 48–52. [Ignatovich V.F. Antigenic relations of Rickettsia of Prowazeki and Rickettsia Canada established in the study of sera of patients with Brill's disease. Zhurnal gigieny, epidemiologii, mikrobiologii i immunologii = Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, 1977, vol. 21, no. 1, pp. 48–52. (In Russ.)]
 8. Мазур М. Качественная теория информации. М.: Мир, 1974. 240 с. [Mazur M. Kachestvennaya teoriya informatsii. [Qualitative theory of information]. Moscow: Mir, 1974. 240 p.]
 9. Марков А.В., Захаров И.А. Использование количественных мер сходства генных порядков для построения филогенетических реконструкций на примере бактерий рода Rickettsia // Генетика. 2008. Т. 44, № 4. С. 456–466. [Markov A.V., Zakharov I.A. Application of quantitative measures of gene order similarity to phylogenetic reconstructions for bacteria's of the genus Rickettsia. Genetika = Genetics, 2008, vol. 44, no. 4, pp. 456–466. (In Russ.)]
 10. Павловский Е.Н. Основные положения учения о природной очаговости болезней. Эпидемиология и принципы борьбы с инфекционными болезнями. М.: Медицина, 1965, с. 285–308. [Pavlovskii E.N. Osnovnye polozheniya ucheniya o prirodnoi ochagovosti boleznei. Epidemiologiya i printsipy bor'by s infektsionnymi boleznyami [The main provisions of the doctrine of natural foci of disease. Epidemiology and principles of infectious disease control]. Moscow: Meditsina, 1965, pp. 285–308]
 11. Шпынов С.Н., Гуменюк А.С., Поздниченко Н.Н. Применение числовой характеристики строя нуклеотидов в геномах прокариот для рекласификации внутри рода Rickettsia // Математическая биология и биоинформатика. 2016. Т. 11, № 2. С. 87–101. [Shpynov S.N., Gumenuk A.S., Pozdnichenko N.N. Application of the numerical characteristic of formal order analysis of the prokaryotic genomes for reclassification within the genus Rickettsia. Matematicheskaya biologiya i bioinformatika = Mathematical Biology and Bioinformatics, 2016, vol. 11, no. 2, pp. 336–350. doi: 10.17537/2016.11.336 (In Russ.)]
 12. Abarca K., Lopez J., Acosta-Jamett G., Martínez-Valdebenito C. Rickettsia felis in Rhipicephalus sanguineus from two distant Chilean cities. Vector Borne Zoonotic Dis., 2013, vol. 13, iss. 8, pp. 607–609. doi: 10.1089/vbz.2012.1201
 13. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., 1990, vol. 215, no. 3, pp. 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
 14. Angelakis E., Mediannikov O., Parola P., Raoult D. Rickettsia felis: the complex journey of an emergent human pathogen. Trends Parasitol., 2016, vol. 32, iss. 7, pp. 554–564. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.009
 15. Anstead C.A., Chilton N.B. A novel Rickettsia species detected in vole ticks (Ixodes angustus) from Western Canada. Appl. Environ. Microbiol., 2013, vol. 79, no. 24, pp. 7583–7589. doi: 10.1128/AEM.02286-13
 16. Azad A.F. Epidemiology of murine typhus. Ann. Rev. Entomol., 1990, vol. 35, pp. 553–569. doi: 10.1146/annurev.en.35.010190.003005
 17. Azad A.F., Radulovic S., Higgins J.A., Noden B.H., Troyer J.M. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. Emerg. Infect. Dis., 1997, vol. 3, no. 3, pp. 319–327. doi: 10.3201/eid0303.970308
 18. Bechah Y., Capo C., Mege J.L., Raoult D. Epidemic typhus. Lancet Infect. Dis., 2008, vol. 8, iss. 7, pp. 417–426. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70150-6
 19. Bechah Y., Karkouri K.E., Mediannikov O., Leroy Q., Pelletier N., Robert C., Médigue C., Mege J.L., Raoult D. Genomic, proteomic, and transcriptomic analysis of virulent and avirulent Rickettsia prowazekii reveals its adaptive mutation capabilities. Genome Res., 2010, vol. 20, no. 5, pp. 655–663. doi: 10.1101/gr.103564.109
 20. Bishop-Lilly K.A., Ge H., Butani A., Osborne B., Verratti K., Mokashi V., Nagarajan N., Pop M., Read T.D., Richards A.L. Genome sequencing of four strains of Rickettsia prowazekii, the causative agent of epidemic typhus, including one flying squirrel isolate. Genome Announc., 2013, vol. 1, no. 3: e00399-13. doi: 10.1128/genomeA.00399-13
 21. Choi Y.-J., Lee E.-M., Park J.-M., Lee K.-M., Han S.-H., Kim J.-K., Lee S.-H., Song H.-J., Choi M.-S., Kim I.-S., Park K.-H., Jang W.-J. Molecular detection of various Rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in southern Jeolla Province, Korea. Microbiol. Immunol., 2007, vol. 51, iss. 3, pp. 307–312. doi: 10.1111/j.1348-0421.2007.tb03912.x
 22. Civen R., Ngo V. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. Clin. Infect. Dis., 2008, vol. 46, iss. 6, pp. 913–918. doi: 10.1086/527443
 23. Clark T.R., Noriega N.F., Bublitz D.C., Ellison D.W., Martens C., Lutter E.I., Hackstadt T. Comparative genome sequencing of Rickettsia rickettsii strains that differ in virulence. Infect. Immun., 2015, vol. 83, no. 4, pp. 1568–1576. doi: 10.1128/IAI.03140-14
 24. Dieme C., Bechah Y., Socolovschi C., Audoly G., Berenger J.M., Faye O., Raoult D., Parola P. Transmission potential of Rickettsia felis infection by Anopheles gambiae mosquitoes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2015, vol. 112, no. 26, pp. 8088–8093. doi: 10.1073/pnas.1413835112
 25. Eisen J.A., Fraser C.M. Phylogenomics: intersection of evolution and genomics. Science, 2003, vol. 300, iss. 5626, pp. 1706–1707. doi: 10.1126/science.1086292
 26. Ereemeeva M.E., Dasch G.A., Silverman D.J. Quantitative analyses of variations in the injury of endothelial cells elicited by 11 isolates of Rickettsia rickettsii. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2001, vol. 8, no. 4, pp. 788–796. doi: 10.1128/CDLI.8.4.788-796.2001
 27. Felsheim R.F., Kurtti T.J., Munderloh U.G. Genome sequence of the endosymbiont Rickettsia peacockii and comparison with virulent Rickettsia rickettsii: identification of virulence factors. PLoS One, 2009, vol. 4, iss. 12: e8361. doi: 10.1371/journal.pone.0008361
 28. Fournier P.-E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of Rickettsia heilongjiangensis sp. nov. J. Clin. Microbiol., 2003, vol. 41, no. 12, pp. 5456–5465. doi: 10.1128/JCM.41.12.5456-5465.2003
 29. Fournier P.-E., Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of Rickettsia spp. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2009, vol. 1166, iss. 1, pp. 1–11. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x

30. Gillespie J.J., Beier M.S., Rahman M.S., Ammerman N.C., Shallom J.M., Purkayastha A., Sobral B.S., Azad A.F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One*, 2007, iss. 3: e266. doi: 10.1371/journal.pone.0000266
31. Gillespie J.J., Williams K., Shukla M., Snyder E.E., Nordberg E.K., Ceraul S.M., Dharmannolla C., Rainey D., Soneja J., Shallom J.M., Vishnubhat N.D., Wattam R., Purkayastha A., Czar M., Crasta O., Setubal J.C., Azad A.F., Sobral B.S. Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PLoS One*, 2008, vol. 3, iss. 4: e2018. doi: 10.1371/journal.pone.0002018
32. Ishikura M., Ando S., Shinagawa Y., Matsuura K., Hasegawa S., Nakayama T., Fujita H., Watanabe M. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on *gltA*, 17-kDa, and *rOmpA* genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 2003, vol. 47, no. 11, pp. 823–832. doi: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03448.x
33. Jado I., Oteo J.A., Aldámiz M., Gil H., Escudero R., Ibarra V., Portu J., Portillo A., Lezaun M.J., García-Amil C., Rodríguez-Moreno I., Anda P. Rickettsia monacensis and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 9, pp. 1405–1407. doi: 10.3201/eid1309.060186
34. Jiang J., Maina A.N., Knobel D.L., Cleaveland S., Laudisoit A., Wamburu K. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia asemboensis* in fleas from human habitats, Asembo, Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2013, vol. 13, iss. 8, pp. 550–558. doi: 10.1089/vbz.2012.1123
35. Koonin E.V., Mushegian A.R., Galperin M.Y., Walker D.R. Comparison of archaeal and bacterial genomes: computer analysis of protein sequences predicts novel functions and suggests a chimeric origin for the archaea. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 25, iss. 4, pp. 619–637. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4821861.x
36. Krantz G.W., Walter D.E. A manual of acarology. 3rd ed. Lubbock: Texas Tech University Press, 2009. 807 p.
37. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, iss. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
38. Linnemann C.C., Petzman C.I., Peterson E.D. Acute febrile cerebrovasculitis. A non-spotted fever group rickettsial disease. *Arch. Intern. Med.*, 1989, vol. 149, no. 7, pp. 1682–1684. doi: 10.1001/archinte.1989.00390070182031
39. Mediannikov O., Aubadie-Ladrix M., Raoult D. *Candidatus Rickettsia senegalensis* in cat fleas in Senegal. *New Microbes New Infect.*, 2015, vol. 3, pp. 24–28. doi: 10.1016/j.nmni.2014.10.005
40. Merhej V., Angelakis E., Socolovschi C., Raoult D. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. *Infect. Genet. Evol.*, 2014, vol. 25, pp. 122–137. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.014
41. Merhej V., Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 2011, vol. 86, iss. 2, pp. 379–405. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x
42. Nichols E., Rindge M.E., Russell G.G. The relationship of the habits of the house mouse and the mouse mite (*Allodermanyssus sanguineus*) to the spread of rickettsialpox. *Ann. Intern. Med.*, 1953, vol. 39, no. 1, pp. 92–102. doi: 10.7326/0003-4819-39-1-92
43. Nicholson W.L., Allen K.E., McQuiston J.H., Breitschwerdt E.B., Little S.E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.*, 2010, vol. 26, iss. 4, pp. 205–212. doi: 10.1016/j.pt.2010.01.007
44. Oliveira K.A., Oliveira L.S., Dias C.C.A., Silva Jr.A., Almeida M.R., Almada G., Bouyer D.H., Galvão M.A.M., Mafra C.L. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008, vol. 103, no. 2, pp. 191–194. doi: 10.1590/S0074-02762008000200011
45. Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.-E., Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 26, no. 4, pp. 657–702. doi: 10.1128/CMR.00032-13
46. Prusinski M.A., White J.L., Wong S.J., Conlon M.A., Egan C., Kelly-Cirino C.D., Laniewicz B.R., Backenson P.B., Nicholson W.L., Eremeeva M.E., Karpathy S.E., Dasch G.A., White D.J. Sylvatic typhus associated with flying squirrels (*Glaucomys volans*) in New York State, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2014, vol. 14, iss. 4, pp. 240–244. doi: 10.1089/vbz.2013.1392
47. Raoult D., Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, vol. 10, no. 4, pp. 694–719.
48. Reif K.E., Macaluso K.R. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J. Med. Entomol.*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 723–736.
49. Shpynov S., Fournier P.-E., Pozdnichenko N., Gumenyuk A., Skiba A. New approaches in the systematics of Rickettsiae. *New Microbes New Infect.*, 2018, vol. 23, pp. 93–102. doi: 10.1016/j.nmni.2018.02.012
50. Shpynov S., Pozdnichenko N., Gumenuk A. Approach for classification and taxonomy within family Rickettsiaceae based on the Formal Order Analysis. *Microbes Infect.*, 2015, vol. 17, iss. 11–12, pp. 839–844. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.012
51. Simser J.A., Rahman M.S., Dreher-Lesnick S.M., Azad A.F. A novel and naturally occurring transposon, *ISRpel* in the *Rickettsia peacockii* genome disrupting the *rickA* gene involved in actin-based motility. *Mol. Microbiol.*, 2005, vol. 58, iss. 1, pp. 71–79. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04806.x
52. Soares H.S., Barbieri A.R.M., Martins T.F., Minervino A.H.H., de Lima J.T.R., Marcili A., Gennari S.M., Labruna M.B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Exp. Appl. Acarol.*, 2015, vol. 65, iss. 1, pp. 125–140. doi: 10.1007/s10493-014-9851-6
53. Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D., Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. *Vet. Res.*, 2009, vol. 40, no. 4: 34. doi: 10.1051/vetres/2009017
54. Socolovschi C., Pages F., Ndiath M.O., Ratmanov P., Raoult D. Rickettsia species in African Anopheles mosquitoes. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 10: e48254. doi: 10.1371/journal.pone.0048254
55. Stothard D.R., Clark J.B., Fuerst P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus Rickettsia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, vol. 44, iss. 4, pp. 798–804. doi: 10.1099/00207713-44-4-798
56. Tamura A., Ohashi N., Urakami H., Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, iss. 3, pp. 589–591. doi: 10.1099/00207713-45-3-589
57. Traub R., Wisseman C.L.Jr. The ecology of chigger-borne rickettsiosis (scrub typhus). *J. Med. Entomol.*, 1974, vol. 11, iss. 3, pp. 237–303. doi: 10.1093/jmedent/11.3.237
58. Traub R., Wisseman C.L.Jr, Farhang-Azad A. The ecology of murine typhus: a critical review. *Trop. Dis. Bull.*, 1978, vol. 75, no. 4, pp. 237–317.

59. Weiss E., Moulder J.W. Order I. Rickettsiales, Gieszczykiewicz 1939. Bergey's manual of systematic bacteriology. *Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, vol. 1, pp. 687–703.*
60. Wisseman Ch.L.Jr. Observation on global aspects of louse-borne typhus transmission and potential. Proc. Intern. Symp. The control of lice and louse-borne diseases. *Washington, 1973, pp. 60–66.*
61. Zemtsova G., Killmaster L.F., Mumcuoglu K.Y., Levin M.L. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp. Appl. Acarol., 2010, vol. 52, no. 4, pp. 383–392. doi: 10.1007/s10493-010-9375-7*

Авторы:

Шпынов С.Н., д.м.н., руководитель лаборатории экологии риккетсий ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;
Поздниченко Н.Н., старший преподаватель кафедры информатики и вычислительной техники Омского государственного технического университета, г. Омск, Россия;
Гуменюк А.С., к.т.н., доцент кафедры информатики и вычислительной техники Омского государственного технического университета, г. Омск, Россия;
Скиба А.А., инженер-программист кафедры информатики и вычислительной техники Омского государственного технического университета, г. Омск, Россия.

Authors:

Shpynov S.N., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Ecology of Rickettsiae, N.F. Gamaleya Federal Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Pozdnichenko N.N., Senior Lecturer, Informatics and Computer Engineering Department, Omsk State Technical University, Omsk, Russian Federation;
Gumenyuk A.S., PhD (Engineering Sciences), Associate Professor, Informatics and Computer Engineering Department, Omsk State Technical University, Omsk, Russian Federation;
Skiba A.A., Software Developer, Informatics and Computer Engineering Department, Omsk State Technical University, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.09.2017
Отправлена на доработку 18.04.2018
Принята к печати 25.05.2018

Received 21.09.2017
Revision received 18.04.2018
Accepted 25.05.2018

НАРУШЕНИЕ АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ СЕПСИСЕ

С.-Ф. Шен¹, В.-С. Гуан¹, Дж.-Ф. Ду², Л.В. Пузырева³

¹ Нанкинский медицинский университет, г. Нанкин, Китай

² Главный военный госпиталь, Пекин, Китай

³ ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия

Резюме. Сепсис представляет собой угрожающее жизни нарушение функций внутренних органов, вызванное дизрегуляцией макроорганизма инфекционным агентом, и является сложным взаимодействием провоспалительных и противовоспалительных процессов, что нередко определяет судьбу пациента. Предопределяющим фактором сепсиса является именно возбудитель. Вызываемая возбудителем иммуносупрессия способствует генерализации инфекции, а интенсивная бактериемия, обусловленная генерализацией, приводит к нарастающей эндотоксинемии, что еще больше усугубляет иммуносупрессию и приводит в конечном итоге к системной воспалительной реакции — основному и наиболее опасному проявлению сепсиса. В основе сепсиса лежит синдром системного воспаления с неконтролируемым выбросом цитокинов. Патологически сепсис начинается с бурной воспалительной реакции, которая может длиться несколько дней, а затем переходить в более затяжной иммуносупрессивный период, исход которого зависит от иммунной системы больного. Клеточный апоптоз является одним из ведущих компонентов развития иммуносупрессии при сепсисе. Нарушения механизмов апоптоза нейтрофилов утяжеляют течение сепсиса и могут приводить к неблагоприятному исходу. Миграция нейтрофилов в естественных условиях включает четыре различные фазы, которые также нарушаются во время сепсиса. Механизмы, ухудшающие миграцию нейтрофилов и способствующие развитию сепсиса, были исследованы в многочисленных научных работах. Авторами Пекинского университета предложены схемы нарушения апоптоза нейтрофилов и миграции нейтрофилов при сепсисе. Несмотря на огромный накопленный опыт по изучению патогенеза септических состояний, в настоящее время отсутствуют эффективные и специфические средства борьбы с сепсисом. Возможно, одним из путей предотвращения нарушения программированной гибели клетки будет применение антиапоптотических цитокинов, ингибиторов каспаз.

Ключевые слова: сепсис, апоптоз, иммуносупрессия, нейтрофилы, интерлейкины.

DISTURBANCE OF AN APOPTOSIS OF NEUTROPHILS AT A SEPSIS

Shen X.-F.^a, Guan W.-X.^a, Du J.-F.^b, Puzyryova L.V.^c

^a Nanjing University Medical School, Nanjing, China

^b General Military Hospital, Beijing, China

^c Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Abstract. The sepsis represents life-endangering disturbances of functions of the internals caused by a dizregulation of a macroorganism to the infectious agent and is difficult interaction of pro-inflammatory and anti-inflammatory processes that not seldom defines the fate of patients. The predetermining factor of a sepsis is the originator. The immunosuppression caused by the originator promotes generalization of an infection, and the intensive bacteriemia caused by genera-

Адрес для переписки:

Пузырева Лариса Владимировна
644010, Россия, г. Омск, ул. Сергея Лазо, 2,
Омский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (3812) 53-26-66.
E-mail: puzirevalv@mail.ru

Contacts:

Larisa V. Puzyryova
644010, Russian Federation, Omsk, Sergey Lazo str., 2,
Omsk State Medical University.
Phone: +7 (3812) 53-26-66.
E-mail: puzirevalv@mail.ru

Библиографическое описание:

Шен С.-Ф., Гуан В.-С., Ду Дж.-Ф., Пузырева Л.В. Нарушение апоптоза нейтрофилов при сепсисе // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 119–126. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-119-126

Citation:

Shen X.-F., Guan W.-X., Du J.-F., Puzyryova L.V. Disturbance of an apoptosis of neutrophils at a sepsis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 119–126. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-119-126

lization leads to the accruing endotoxemia that aggravates immunosuppression even more and leads finally to systemic inflammatory reaction — the main and most dangerous implication of a sepsis. The syndrome of systemic inflammation with uncontrollable emission of cytokines is the cornerstone of a sepsis. The pathophysiology of a sepsis begins with impassioned inflammatory reaction which can last several days, and then passes into more lingering immunosuppressive period where the outcome depends on the immune system of the patient. Cellular apoptosis is one of leaders in sepsis immunosuppression development. In article mechanisms of disturbance of an apoptosis of neutrophils are described that, undoubtedly, affects weighting of a current of a sepsis and as a result, a failure. Migration of neutrophils under natural conditions includes four various phases which during a sepsis are broken. The mechanisms worsening migration of neutrophils, contributing to the development of a sepsis were investigated in numerous scientific works. Authors of Peking University offered schemes of a way of disturbance of an apoptosis of neutrophils and migration of neutrophils at a sepsis. Despite the extensive accumulated experience on studying of a pathogenesis of septic states, there are no effective and specific remedies of fight from a sepsis now. Perhaps, by prevention of disturbance of the programmed death of a cell the cytokines developed anti-apoptotic, caspase inhibitors will be.

Key words: *sepsis, apoptosis, immunosuppression, neutrophils, interleukins.*

Сепсис остается ведущей причиной смерти в отделениях интенсивной терапии, несмотря на улучшение ранней диагностики и достигнутые успехи в лечении данной нозологии. Сепсис является частым осложнением целого ряда заболеваний, однако в случае летального исхода в статистических документах причиной смерти указывается основное заболевание, что приводит к «занижению» показателей заболеваемости и смертности от сепсиса. Распространенность сепсиса оценивается в 300 случаев на 100 тыс. человек по всему миру. В США ежегодно регистрируется 30–53 тыс. случаев сепсиса с летальностью 30–90% [21].

Сепсис развивается вследствие постоянной циркуляции в крови возбудителя на фоне иммуносупрессии. Предшествующие иммуносупрессирующие заболевания (диабет, цирроз печени, удаление селезенки, ожоговая болезнь, онкогематологические процессы и другие) предрасполагают к сепсису, но не определяют его. Преопределяющим фактором сепсиса является именно возбудитель [1].

Вызываемая возбудителем иммуносупрессия способствует генерализации инфекции, а интенсивная бактериемия приводит к нарастающей эндотоксинемии, что еще больше усугубляет иммуносупрессию и приводит в конечном итоге к системной воспалительной реакции — основному и наиболее опасному проявлению сепсиса. Прогрессирующая системная воспалительная реакция определяет особую злокачественность (ацикличность) сепсиса, поскольку приводит к полиорганной недостаточности и септическому шоку.

После бактериального инфицирования течение и исход инфекционного процесса решающим образом зависит от запрограммированной клеточной смерти. Внутриклеточные патогены могут индуцировать или подавлять сигнальные пути клеточной смерти в инфицированных клетках в зависимости от продолжительности внутриклеточного периода. Многие бактериальные па-

тогены блокируют апоптоз путем повреждения соответствующих сигнальных путей, что является частью стратегии их выживания в клетках, защищенных от апоптоза. Например, *Salmonella enterica* использует разнообразные стратегии, которые могут предотвращать апоптоз в клетках хозяина или способствовать ему, что является частью реализации их вирулентности при кишечных инфекциях [5].

Известно, что при апоптозе, в отличие от некроза, не индуцируется воспалительный ответ. Образованные в процессе апоптоза апоптотические тельца бесследно поглощаются макрофагами. Напротив, некротический путь гибели клеток индуцирует выраженный воспалительный ответ на продукты клеточного распада, что в определенных случаях может также использоваться патогенами для притока в зону воспаления «свежих» клеток, обеспечивающих размножающиеся патогены новыми зонами обитания [5, 10, 12].

Многие ученые занимались анализом и механизмом патофизиологии сепсиса. Анализировалась роль различных иммунных клеток, про- и противовоспалительных цитокинов и т. д. [22, 29, 36, 43]. Цитокины являются важнейшими медиаторами, которые регулируют воспалительные реакции. Во время сепсиса, провоспалительных цитокинов в организме больного в избытке, особенно интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли α (TNF α). Они преобладают в острой фазе сепсиса и являются основными возбудителями для гипервоспалительной реакции [19].

Различные типы гемопоэтических клеток участвуют в воспалительной реакции, воздействуя на микробную клетку. Первой линией обороны являются циркулирующие нейтрофилы, устремляющиеся в зараженные или поврежденные ткани. Они являются ключевыми регуляторами первоначальной реакции на микробную инфекцию. Однако из-за нарушения запрограммированной гибели нейтрофи-

лов при воспалительных заболеваниях, включая сепсис, они сохраняются в тканях и крови, являясь предвестниками неблагоприятного прогноза [34].

Нейтрофилы представляют собой одну из самых многочисленных популяций циркулирующих лейкоцитов. Их называют «профессиональными» фагоцитами [8].

Как и все клетки белой крови, нейтрофилы происходят от гемопоэтических стволовых клеток костного мозга и развиваются по миелоидной ветви кроветворения. Пройдя стадии миелобласта, промиелоцита, миелоцита и палочкоядерного нейтрофила, становятся зрелыми, превращаясь в сегментоядерный нейтрофил. На стадии развития палочкоядерного нейтрофила клетки начинают мигрировать из костного мозга в кровь, где циркулируют 6–12 ч. Нейтрофилы имеют самый короткий срок жизни среди лейкоцитов и подвержены апоптозу, главному компоненту врожденного иммунитета. Они генерируют различные протеолитические ферменты, активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота необходимые для уничтожения вторгшихся микроорганизмов после фагоцитоза.

Апоптоз имеет значение для регуляции гомеостаза нейтрофилов. Этот процесс имеет решающее значение для прекращения воспалительного ответа и восстановления ткани. После выполнения своих функций, в воспалительном очаге нейтрофилы подвергаются апоптозу [17]. Известно, что патогенез гнойно-септических заболеваний связан с развитием системной воспалительной реакции, а анергия и апоптоз играют важную роль механизма ограничения этой системной воспалительной реакции за счет элиминации клеток, продуцирующих провоспалительные цитокины, что приводит к положительному исходу [11, 43]. В некоторых случаях происходит либо ускорение, либо подавление запрограммированной смерти клетки. Подавление апоптоза нейтрофилов часто обнаруживается у пациентов с воспалительной патологией, включая сепсис и септический шок, и является признаком неблагоприятного исхода [34].

Воздействие нейтрофилов на воспалительные медиаторы, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), IL-8 или бактериальные частицы, приводит к задержке апоптоза [25, 30]. Сохранение функции нейтрофилов в местах

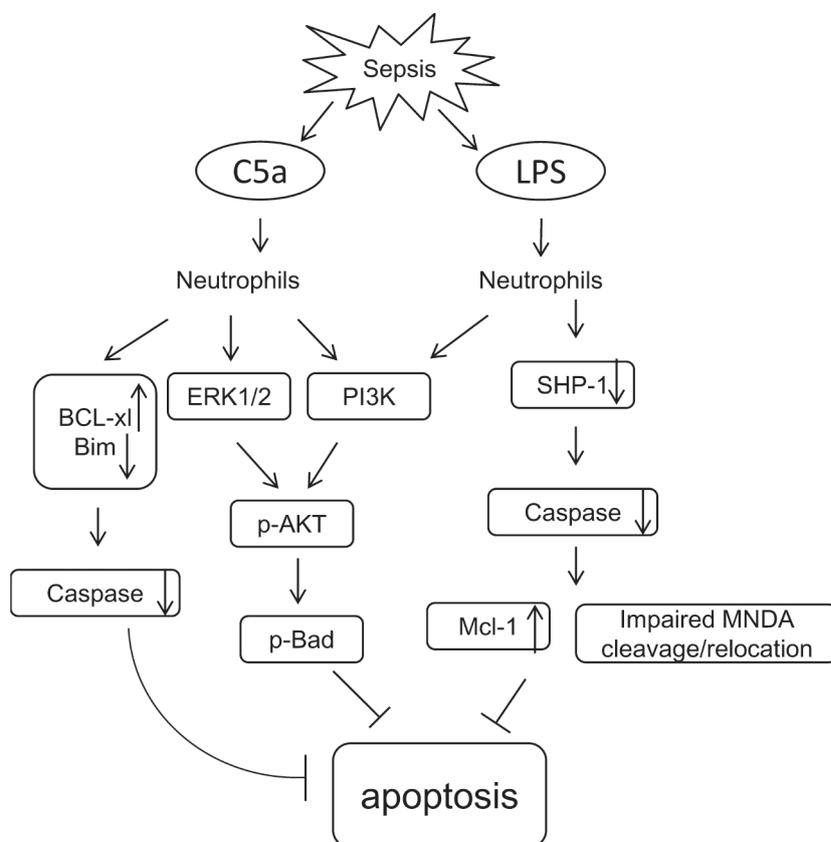


Рисунок 1. Пути нарушения апоптоза нейтрофилов при сепсисе

Figure 1. Ways of disturbance of an apoptosis of neutrophils at a sepsis

Схема разработана: Shen X.-F., Cao K., Jiang J.-P., Guan W.-X., Du J., 2017 [40].

The scheme is developed: Shen X.-F., Cao K., Jiang J.-P., Guan W.-X., Du J., 2017 [40].

инфекционной патологии необходимо для полного устранения внедрившихся инфекционных агентов. Однако это может ухудшить состояние раны и привести к длительному незаживлению тканей. Поэтому регулирование апоптоза нейтрофилов очень важно, чтобы управлять балансом между их антимикробной эффективностью и потенциально вредным воздействием на ткани организма.

При нормальных условиях циркулирующие нейтрофилы обладают коротким периодом полураспада (7–12 ч в естественных условиях), но отмечается увеличение продолжительности их жизни при сепсисе.

Активатором патологических процессов в организме больного при септических состояниях являются компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий — липополисахариды (LPS), в распознавании которых участвуют специфические рецепторы клеток-мишеней CD14, $\beta 2$ -интегрин (CD11/CD18). Эти рецепторы, совместно с другими белками при активации клеток-мишеней эндотоксинами образуют рецепторный комплекс [15].

Уровень антиапоптотического белка семейства Bcl-2 — MCL (myeloid cell leukemia 1) играет ключевую роль в апоптозе нейтрофила. У пациентов с тяжелым сепсисом отмечалось его увеличение [32], что влияло на развитие устойчивости нейтрофилов к апоптозу. Провоспалительные медиаторы, такие как липополисахарид (LPS) и C5-компонент комплемента (C5a) в периферической крови могут вызвать активацию регуляции внеклеточной протеинкиназы (ERK 1/2) и фосфоинозитид-3-киназы (PI-3K) в нейтрофилах, которые приводят к увеличению антиапоптотического мультидоменального белка Bcl-XL [26, 35]. Возникает дизрегуляция апоптотических механизмов: выработка белка, вовлеченного в механизм апоптоза (p-Akt) что приводит к активации белка Bad (p-Bad), который ингибирует апоптоз нейтрофилов [41]. Кроме того, воздействие LPS может также уменьшить активность SHP-1-тирозинфосфатазы, состоящей из двух доменов. В дальнейшем происходит снижение активности каспазы-8, что приводит к снижению ядерного фактора MNDA (myeloid nuclear differentiation antigen), накоплению Mcl-1 и, как следствие, к су-

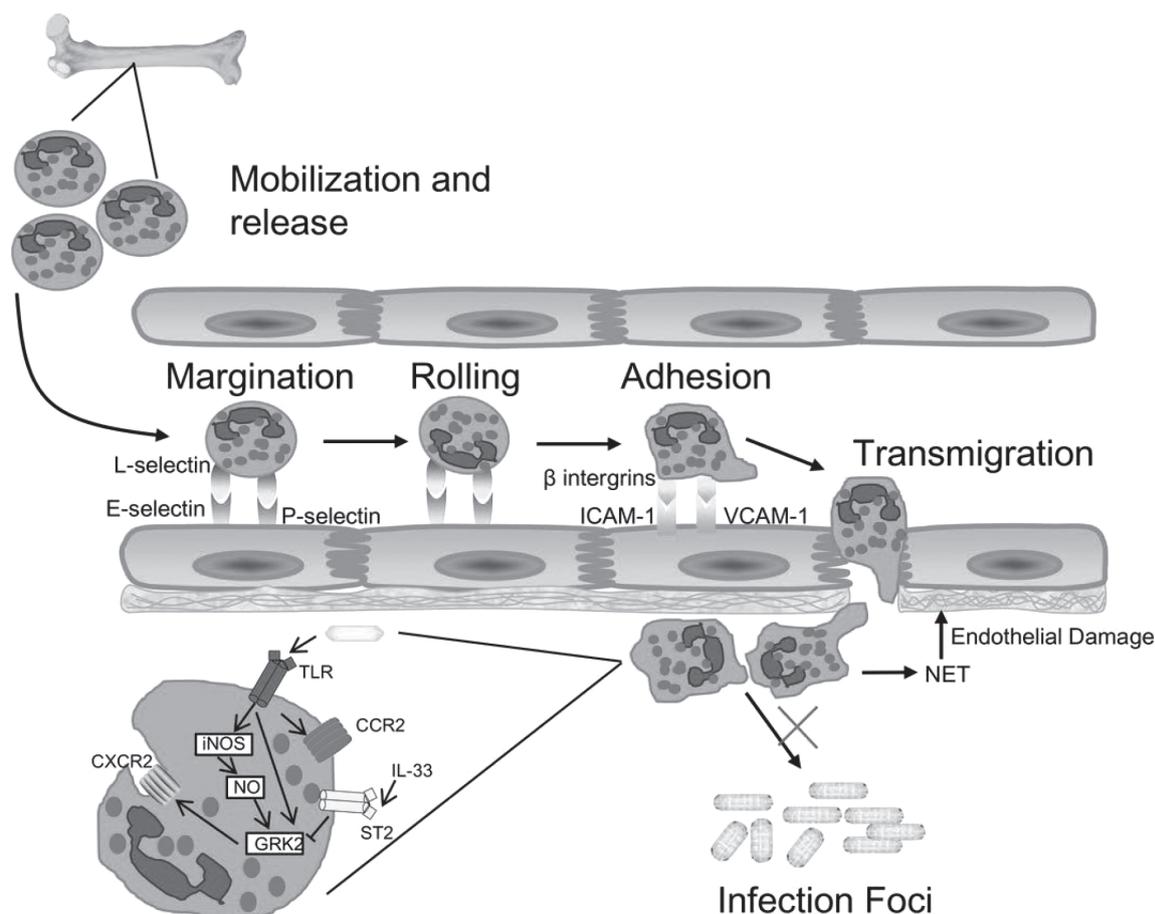


Рисунок 2. Миграция нейтрофилов при сепсисе

Figure 2. Migration of neutrophils at a sepsis

Схема разработана: Shen X.-F., Cao K., Jiang J.-P., Guan W.-X., Du J., 2017 [40].

The scheme is developed: Shen X.-F., Cao K., Jiang J.-P., Guan W.-X., Du J., 2017 [40].

прессии апоптоза нейтрофила [34] (рис. 1). Одним из внешних факторов, запускающих апоптоз, является Fas-лиганд (FasL) и TNF α , которые связываются с определенными рецепторами на нейтрофилах, что способствует замедлению апоптоза нейтрофилов [28, 39], лимфоцитов [11], макрофагов и моноцитов при сепсисе [2].

Ингибирование апоптоза нейтрофилов является одной из причин неэффективного клиренса этих клеток, что способствует повреждению тканей при воспалении [15].

Индукция апоптоза при сепсисе может осуществляться двумя путями: либо через экспрессию Fas-рецепторов плазматической мембраны (внешний путь), либо через снижение мембранного потенциала митохондрий (внутренний путь) [24]. Лабораторными маркерами апоптоза иммунокомпетентных клеток являются выраженная экспрессия белков CD95 (Fas-рецептор) и CD120 (рецептор к фактору некроза опухоли) на плазматических мембранах, снижение мембранного потенциала митохондрий и высвобождение цитохрома С, транслокация фосфатидилсерина с внутренней на наружную поверхность мембраны клеток, повышение активности каспаз [13, 14, 24].

Миграция нейтрофилов при сепсисе. Миграция нейтрофилов в естественных условиях включает четыре различных фазы, которые нарушаются во время сепсиса: мобилизация и выход из костного мозга, краевое стояние и вращение, адгезия и трансмиграция (проникновение нейтрофилов из кровотока в ткани) [37]. Механизмы, ухудшающие миграцию нейтрофилов, способствующие развитию сепсиса, были исследованы в многочисленных научных работах [40] (рис. 2).

Во время сепсиса стимуляция нейтрофилов происходит системно с нарушением миграции в очаг инфекции. Бактериальные компоненты могут активировать систему Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors — TLRs), которые экспрессируются на поверхности нейтрофилов, что приводит к регуляции GRK2 (киназа, связывающей G-белок рецептора (GRK) 2 семейства, экспрессированных в различных тканях). Все это в результате приводит к десенсибилизации растворимой формы рецептора IL-8 — CXCR2 на поверхности нейтрофилов. IL-33 могут ликвидировать последствия воздействия GRK2 на CXCR2, направляя нейтрофилы к месту инфекции. Кроме того, активация TLRs может также регулировать экспрессию CCR2 на поверхности нейтрофилов, способствуя миграции нейтрофилов в отдаленные органы.

Высвобождение нейтрофилов. В костном мозге гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) и GM-CSF влияют на гранулоцитопоэз [31]. Хемокины и молекулы адгезии

экспрессируются на нейтрофилах и клетках эндотелия костного мозга и играют центральную роль в регуляции выхода нейтрофилов в кровь. В нормальных условиях баланс хемокинов и их рецепторов помогает поддерживать нейтрофилы в костном мозге, при этом лишь небольшая часть зрелых нейтрофилов высвобождается в кровь. При сепсисе провоспалительные цитокины, такие как TNF α , IL-1 β , IL-6 и IL-17 и продукты жизнедеятельности бактерий могут регулировать уровень G-CSF, который в свою очередь вызывает пролиферацию и дифференцировку клеток гранулоцитарного ростка кроветворения и может активировать стволовые клетки. Также он влияет на функции зрелых нейтрофилов, продукция которых может значительно возрастет при воздействии бактериального эндотоксина.

Известно, что при сепсисе наблюдается увеличение провоспалительных цитокинов CXCL1 и снижение CXCL12, что приводит к высвобождению нейтрофилов в кровь [20, 23, 25]. Последующие исследования показали, что взаимодействие CXCR4 и CXCL2 играет ключевую роль в выходе нейтрофилов без участия TLRs4, которые включаются с помощью адаптерного белка MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88) и TIR-домена, содержащих адаптер, индуцирующий IFN β (TRIF) [20].

Коллектив авторов анализировал кожные лоскуты у пациентов с сепсисом. Было выявлено, что миграция нейтрофилов в воспалительный очаг снижена, при этом фагоцитарная и бактерицидная их активность была выше по сравнению с группой здоровых людей [16]. Другие исследователи показали, что в поврежденных тканях при сепсисе повышалась базальная активация нейтрофилов, в то же время при повторном заражении инфекционным агентом отмечалась их сниженная реакция и миграция в очаг воспаления [38].

Сепсис в организме человека вызывает глубокое угнетение апоптоза нейтрофилов, что было подтверждено в группе пациентов, перенесших сепсис или множественные травмы. Есть мнение, что данный феномен может вызывать апоптотическую гибель и других клеток путем дефосфорилирования эпителиальных клеток каспазы-8 и индуцировать апоптотическую гибель лимфоцитов CD4⁺ [42].

Практически все цитокины, избыточно продуцируемые при системном воспалительном ответе, могут быть индукторами апоптоза иммунореактивных клеток. При этом в клетках одного типа тот или иной цитокин запускает апоптоз, а в других клетках его ингибирует. Например, было подтверждено, что при остром повреждении легочной ткани в очагах нейтро-

фильного воспаления в альвеолах регистрировалась задержка апоптоза нейтрофилов с одновременным ускорением апоптоза эпителиальных клеток [9, 33]. При гнойно-септических заболеваниях (перитонит) на начальных этапах септического шока отмечалось снижение апоптоза нейтрофилов и повышенный апоптоз активированных Т-клеток [11].

Несмотря на огромный накопленный опыт по изучению патогенеза септических состояний, в настоящее время отсутствуют эффективные и специфические средства борьбы с сепсисом [3, 4]. Основными направлениями являются: поиск новых антибактериальных препаратов [18], использование антител против липида А и О-антигена LPS [17], блокада специфических провоспалительных медиаторов [7, 27] и многое другое. Было предложено два уровня возможного влияния на регуляцию апоптоза: влияние на специфические мембраны рецепторы, участвующих в регуляции апоптоза клеток-мишеней и воздействие на внутриклеточные пути регуляции апоптоза [4].

Было проведено исследование по изучению механизма действия анти-Fas моноклональных антител и ультрафиолетового излучения диапазона С (254 нм, УФС), применяемого в клинической медицине при экстракорпоральном облучении периферической крови на регуляцию апоптоза нейтрофилов в присутствии эндотоксинов. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой способности ультрафиолетового излучения по сравнению с анти-Fas моноклональными антителами снижать эндотоксининдуцированное ингибирование апоптоза нейтрофилов [4, 6].

Очевидно, что проблема сепсиса тесно связана с нарушением апоптоза нейтрофилов. Необходимо предотвратить нарушение программированной гибели клетки путем, например, антиапоптозных цитокинов, ингибиторов каспаз и т. д., что повысит выживаемость при сепсисе. Так как нейтрофилы являются важной составляющей в патогенезе развития сепсиса, необходимо продолжать исследования в области апоптоза этих клеток.

Список литературы/References

1. Бабаев М.А., Тарасова Н.Ю., Бирг Т.М., Дымова О.В. Сепсис — терминология и критерии диагностики: эволюция взглядов на проблему // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2016. № 2. С. 35–46. [Babayev M.A., Tarasova N.Yu., Birg T.M., Dymov O.V. Sepsis — terminology and criteria of diagnostics: evolution of views on a problem. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya. Zhurnal imeni akademika B.V. Petrovskogo = Clinical and Experimental Surgery. Journal of Academician B.V. Petrovsky*, 2016, no. 2, pp. 35–46. (In Russ.)]
2. Богданова И.М. Иммунологические механизмы сепсиса и новые подходы к его терапии // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 3. С. 52–58. [Bogdanova I.M. Immunologic mechanisms of a sepsis and new campaigns to its therapy. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*, 2014, no. 3, pp. 52–58. (In Russ.)]
3. Булава Г.В. Иммунологические аспекты сепсиса (обзор литературы) // Неотложная медицинская помощь. 2013. № 2. С. 47–56. [Bulava G.V. Immunologic aspects of a sepsis (review of literature). *Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch' = Emergency Medical Care*, 2013, no. 2, pp. 47–56. (In Russ.)]
4. Винокуров М.Г., Юринская М.М. Регуляция апоптоза нейтрофилов при действии липополисахаридов // Биологические мембраны. 2010. Т. 27, № 1. С. 18–27. [Vinokurov M.G., Yurinskaya M.M. A regulation of an apoptosis of neutrophils at action of lipopolisakharid. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes*, 2010, vol. 27, no. 1, pp. 18–27. (In Russ.)]
5. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Взаимодействия патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С. 581–596. [Garib F.Yu., Rizopulu A.P. Interactions of pathogenic bacteria with congenital immune reactions of the owner. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 581–596. doi: 10.15789/2220-7619-2012-3-581-596 (In Russ.)]
6. Грачев С.В., Юринская М.М., Тихоненко С.А., Винокуров М.Г. Механизмы регуляции апоптоза нейтрофилов человека при действии эндотоксинов и индукторов апоптоза // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 20, № 2. С. 18–20. [Grachev S.V., Yurinskaya M.M., Tikhonenko S.A., Vinokurov M.G. Mechanisms of a regulation of an apoptosis of neutrophils of the person at action of endotoxins and inductors of an apoptosis. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Herald of New Medical Technologies*, 2013, vol. 20, no. 2, pp. 18–20. (In Russ.)]
7. Ермак И.М., Давыдова В.Н. Взаимодействие бактериальных липополисахаридов с растворимыми белками микроорганизма и поликатионами // Биологические мембраны. 2008. Т. 25, № 5. С. 323–342. [Yermak I.M., Davydova V.N. Interaction of bacteriemic lipopolisakharid with soluble proteins of a microorganism and polycations. *Biologicheskie membrany = Biological Membranes*, 2008, vol. 25, no. 5, pp. 323–342. (In Russ.)]
8. Игнатов П.Е. Иммунитет и инфекция. М.: Время, 2002. 352 с. [Ignatov P.E. *Immunitet i infektsiya [Immunity and infection]*. Moscow: Vremya, 2002. 352 p.]
9. Козлов В.К. Сепсис, тяжелый сепсис, септический шок: патогенетическое обоснование диагноза, клиническая интерпретация, принципы и методы диагностики // Клинико-лабораторный консилиум. 2014. № 2 (49). С. 20–40. [Cozlov V.K. Sepsis, serious sepsis, septic shock: pathogenetic justification of the diagnosis, clinical interpreting, principles and diagnostic methods. *Kliniko-laboratornyi konsilium = Clinical Laboratory Consilium*, 2014, no. 2 (49), pp. 20–40. (In Russ.)]
10. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 4. С. 23–32. [Korotina O.L., Generalov I.I. Neutrophilic extracellular traps: mechanisms of education, function. *Immunopatologiya, alergologiya, infektologiya = Immunopathology, Alergology, Infectology*, 2012, no. 4, pp. 23–32. (In Russ.)]

11. Норкин М.Н., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тюрин И.Н., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль апоптоза и анергии Т-клеток в патогенезе гнойно-септических заболеваний // Медицинская иммунология. 2000. Т. 2, № 1. С. 35–42. [Norkin M.N., Lepkina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyurin I.N., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Role of an apoptosis and anergy of T-cells in a pathogenesis of purulent-septic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, vol. 2, no. 1, pp. 35–42. (In Russ.)]
12. Потапнев М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология. 2014. № 2. С. 95–102. [Potapnev M.P. Autophagy, apoptosis, necrosis of cells and immune recognition of self and nonself. *Immunologiya = Immunology*, 2014, no. 2, pp. 95–102. (In Russ.)]
13. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В. Патофизиология неонатального сепсиса // Вестник современной клинической медицины. 2014. Т. 7, № 6. С. 97–104. [Hayertynov H.S., Anokhin V.A., Boychuk S.V. Patofiziologiya of a neonatal sepsis. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = Herald of Modern Clinical Medicine*, 2014, vol. 7, no. 6, pp. 97–104. (In Russ.)]
14. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Бойчук С.В., Ризванов А.А. Сепсис и апоптоз // Гены и клетки. 2016. Т. 11, № 4. С. 18–21. [Hayertynov H.S., Anokhin V.A., Boychuk S.V., Rizvanov A.A. Sepsis and apoptosis. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 18–21. (In Russ.)]
15. Юринская М.М., Винокуров М.Г., Зацепина О.Г., Гарбуз Д.Г., Гужова И.В., Рожкова Е.А., Сусликов А.В., Карпов В.Л., Евгеньев М.Б. Экзогенные белки теплового шока БТШ70 подавляют эндотоксин-индуцированную активацию нейтрофилов человека // Доклады академии наук. 2009. Т. 426, № 3. С. 406–409. [Yurinskaya M.M., Vinokurov M.G., Zatschina O.G., Garbuz D.G., Guzhova I.V., Rozhkova E.A., Suslikov A.V., Karpov V.L., Evgenyev M.B. Exogenous proteins of thermal shock Btsh70 suppresses an endotoxin-induced activation of neutrophils of the person. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences*, 2009, vol. 426, no. 3, pp. 406–409. (In Russ.)]
16. Ahmed N.A., McGill S., Yee J., Hu F., Michel R.P., Christou N.V. Mechanisms for the diminished neutrophil exudation to secondary inflammatory sites in infected patients with a systemic inflammatory response (sepsis). *Crit. Care Med.*, 1999, vol. 27, pp. 2459–2468.
17. Brade L., Hoist O., Brade H. An artificial glycoconjugate containing the bisphosphorylated glucosamine disaccharide backbone of lipid A binds monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, no. 10, pp. 4514–4517.
18. Brandenburg K., Wiese A. Endotoxin: relationships between structure, function and activity. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004, vol. 4, iss. 11, pp. 1127–1146. doi: 10.2174/1568026043388213
19. Buras J.A., Holzmann B., Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005, vol. 4, pp. 854–865. doi: 10.1038/nrd1854
20. Delano M.J., Kelly-Scumpia K.M., Thayer T.C., Winfield R.D., Scumpia P.O., Cuenca A.G., Harrington P.B., O'Malley K.A., Warner E., Gabilovich S., Mathews C.E., Laface D., Heyworth P.G., Ramphal R., Strieter R.M., Moldawer L.L., Efron P.A. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, pp. 911–918. doi: 10.4049/jimmunol.1100588
21. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M., Sevransky J.E., Sprung C.L., Douglas I.S., Jaeschke R., Osborn T.M., Nunnally M.E., Townsend S.R., Reinhart K., Kleinpell R.M., Angus D.C., Deutschman C.S., Machado F.R., Rubenfeld G.D., Webb S., Beale R.J., Vincent J.L., Moreno R. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.*, 2013, vol. 39, iss. 2, pp. 165–228. doi: 10.1007/s00134-012-2769-8
22. Dounousi E., Torino C., Pizzini P., Cutrupi S., Panuccio V., D'Arrigo G., Abd ElHafeez S., Tripepi G., Mallamaci F., Zoccali C. Intact FGF23 and α -Klotho during acute inflammation/sepsis in CKD patients. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2017, vol. 47, iss. 6, pp. 440–472. doi: 10.1111/eci.12765
23. Eash K.J., Greenbaum A.M., Gopalan P.K., Link D.C. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, no. 7, pp. 2423–2431. doi: 10.1172/JCI41649
24. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007, vol. 35, iss. 4, pp. 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337
25. Geering B., Simon H.U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.*, 2011, vol. 18, no. 9, pp. 1457–1469. doi: 10.1038/cdd.2011.75
26. Guo R.F., Sun L., Gao H., Shi K.X., Rittirsch D., Sarma V.J., Zetoune F.S., Ward P.A. In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, vol. 80, iss. 6, pp. 1575–1583. doi: 10.1189/jlb.0106065
27. Ianaro A., Tersigni M., D'Acquisto F. New insight in LPS antagonist. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2009, vol. 9, no. 3, pp. 306–317. doi: 10.2174/1389557510909030306
28. Iba T., Hashiguchi N., Nagaoka I., Tabe Y., Murai M. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *J. Intensive Care*, 2013, vol. 1, pp. 13. doi: 10.1186/2052-0492-1-13
29. Karampela I., Kandri E., Antonakos G., Vogiatzakis E., Christodoulatos G.S., Nikolaidou A., Dimopoulos G., Armaganidis A., Dalamaga M. Kinetics of circulating fetuin-A may predict mortality independently from adiponectin, high molecular weight adiponectin and prognostic factors in critically ill patients with sepsis: a prospective study. *J. Crit. Care*, 2017, vol. 41, pp. 78–85. doi: 10.1016/j.jcrr.2017.05.004
30. Kebir D., Filep J.G. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *Sci. World J.*, 2010, vol. 10, pp. 1731–1748. doi: 10.1100/tsw.2010.169
31. Kovach M.A., Standiford T.J. The function of neutrophils in sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 25, no. 3, pp. 321–327. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283528c9b
32. Luan Y.Y., Yao Y.M., Xiao X.Z., Sheng Z.Y. Insights into the apoptotic death of immune cells in sepsis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 17–22. doi: 10.1089/jir.2014.0069
33. Martin T. R., Nakamura M., Matute-Bello G. The role of apoptosis in acute lung injury. *Crit. Care Med.*, 2003, vol. 31, suppl. 4, pp. 184–187. doi: 10.1097/01.CCM.0000057841.33876.B1
34. Milot E., Fotouhi-Ardakani N., Filep J.G. Myeloid nuclear differentiation antigen, neutrophil apoptosis and sepsis. *Front. Immunol.*, 2012, vol. 3: 397, 6 p. doi: 10.3389/fimmu.2012.00397

35. Perianayagam M.C., Balakrishnan V.S., Pereira B.J., Jaber D.L. C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 34, pp. 50–56.
36. Plewes K., Kingston H.W.F., Ghose A., Maude R.J., Herdman M.T., Leopold S.J., Ishioka H., Hasan M.M.U., Haider M.S., Alam S., Piera K.A., Charunwatthana P., Silamut K., Yeo T.W., Faiz M.A., Lee S.J., Mukaka M., Turner G.D.H., Anstey N.M., Jackson Roberts L., White N.J., Day N.P.J., Hossain M.A., Dondorp A.M. The glyoxalase system and methylglyoxal-derived carbonyl stress in sepsis: glycotoxic aspects of sepsis pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, iss. 3: 657. doi: 10.3390/ijms18030657
37. Roger T., Calandra T. Interleukin-33 safeguards neutrophils in sepsis. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 6, pp. 638–639. doi: 10.1038/nm0610-638
38. Romaschin A.D., Foster D.M., Walker P.M., Marshall J.C. Let the cells speak: neutrophils as biologic markers of the inflammatory response. *Sepsis*, 1998, vol. 2, iss. 2, pp. 119–125. doi: 10.1023/A:1009769923763
39. Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.*, 1998, vol. 254, iss. 3, pp. 439–459. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2540439.x
40. Shen X.-F., Cao K., Jiang J.-P., Guan W.-X., Du J.-F. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J. Cell. Mol. Med.*, 2017, vol. 21, no. 9, pp. 1687–1697. doi: 10.1111/jcmm.13112
41. Simon H.U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.*, 2003, vol. 193, iss. 1, pp. 101–110. doi: 10.1034/j.1600-065X.2003.00038.x
42. Wang J.F., Li J.B., Zhao Y.J., Yi W.J., Bian J.J., Wan X.J., Zhu K.M., Deng X.M. Up-regulation of programmed cell death 1 ligand 1 on neutrophils may be involved in sepsis-induced immunosuppression: an animal study and a prospective case-control study. *Anesthesiology*, 2015, vol. 122, no. 4, pp. 852–863. doi: 10.1097/ALN.0000000000000525
43. Wang N., Mao L., Yang L., Zou J., Liu K., Liu M., Zhang H., Xiao X., Wang K. Resveratrol protects against early polymicrobial sepsis-induced acute kidney injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress-activated NF-κB pathway. *Oncotarget*, 2017, no. 8, pp. 36449–36461. doi: 10.18632/oncotarget.16860

Авторы:

Шен С.-Ф., кафедра общей хирургии Нанкинского медицинского университета, г. Нанкин, Китай;
Гуан В.-С., кафедра общей хирургии Нанкинского медицинского университета, г. Нанкин, Китай;
Ду Дж.-Ф., кафедра общей хирургии главного военного госпиталя, Пекин, Китай.
Пузырева Л.В., к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия.

Authors:

Shen X.-F., Department of General Surgery, Nanjing Medical University, Nanjing, China;
Guan W.-X., Department of General Surgery, Nanjing Medical University, Nanjing, China;
Du J.-F., Department of General Surgery, PLA Army General Hospital, Beijing, China;
Puzyreva L.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.12.2017
 Принята к печати 14.05.2018

Received 17.12.2017
 Accepted 14.05.2018

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ВИЧ-1 В РЕГИОНАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СТРАН СНГ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТААНАЛИЗ

О.А. Пасечник, А.И. Блох

ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Омск, Россия

Резюме. Настоящий обзор посвящен оценке распространенности рекомбинантных форм ВИЧ в России и странах СНГ, с которыми имеются тесные социально-экономические связи. Был проведен поиск на глубину 8 лет по базам данных Russian Science Citation Index и PubMed. В обзор включены 22 статьи, в которых приведены результаты 35 самостоятельных поперечных исследований. Проведен метаанализ распространенности рекомбинантных форм ВИЧ в приложении Open Meta-analyst по методу Der Simonian & Laird с использованием арксинусовой трансформации и поправочного коэффициента для нулевых результатов. Дополнительно использованы анализ в подгруппах и метарегрессия (по дате сбора материала). Обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 21,3% (95% ДИ 16,2–26,5) и характеризовалась высокой гетерогенностью. Были исследованы образцы крови от 3494 больных ВИЧ-инфекцией, проживающих в различных субъектах РФ и стран СНГ — Беларуси, Казахстане, Кыргызстане, Узбекистане, Таджикистане, Армении, Грузии. Среди субтипов ВИЧ-1 основную долю занимал субтип А (75,6%, n = 2643), субтип В — 5,5% (n = 193), С — 0,8% (n = 31), G — 0,2%, (n = 7), F — 0,14% (n = 5). Среди рекомбинантных форм (n = 616) доля CRF02_AG составляла 39,6% (n = 244), CRF02_AG/A — 32,9% (n = 203), CRF63_02A1 — 15,9% (n = 98), CRF03_AB — 5,2% (n = 32), CRF06_srx — 2,1% (n = 13). Уникальные рекомбинантные формы составили 2,7% (n = 17), в том числе URF63_A1 (2,5%). На территории России наибольшая распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 отмечена на территории Сибирского федерального округа — 33,2% (95% ДИ 12,2–54,1), наименьшая — в Северо-Западном федеральном округе — 1,6% (95% ДИ 0,9–2,3). В странах СНГ наибольшая распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 выявлена в подгруппе среднеазиатских республик — Узбекистана, Таджикистана, Кыргызстана, Казахстана — 51,7% (95% ДИ 38,5–64,9). Обнаружен статистически значимый восходящий тренд метарегрессии. Данный обзор является первым подобным исследованием в России и представляет определенный интерес, однако результаты должны использоваться с осторожностью из-за высокого риска публикационного смещения и существенной гетерогенности обобщенной оценки.

Ключевые слова: ВИЧ-1, распространенность, субтипы, генотипы, циркулирующие рекомбинантные формы.

Адрес для переписки:

Пасечник Оксана Александровна
644050, Россия, г. Омск, ул. Мира, 9, Омский государственный
медицинский университет.
Тел.: 8 (3812) 65-06-54 (служебн.).
E-mail: opasechnik@mail.ru

Contacts:

Oksana A. Pasechnik
644050, Russian Federation, Omsk, Mira str., 9,
Omsk State Medical University.
Phone: +7 (3812) 65-06-54 (office).
E-mail: opasechnik@mail.ru

Библиографическое описание:

Пасечник О.А., Блох А.И. Распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 в регионах Российской Федерации и стран СНГ: систематический обзор и метаанализ // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 127–138. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-127-138

© Пасечник О.А., Блох А.И., 2018

Citation:

Pasechnik O.A., Blokh A.I. The prevalence of HIV recombinant forms in Russia and countries of the CIS: systematic review and meta-analysis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 127–138. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-127-138

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-127-138>

THE PREVALENCE OF HIV RECOMBINANT FORMS IN RUSSIA AND COUNTRIES OF THE CIS: SYSTEMATIC REVIEW AND METAANALYSIS

Pasechnik O.A., Blokh A.I.

Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Abstract. This review was aimed to assess the prevalence of HIV recombinant forms in Russia and countries of the CIS, which have close social and economic ties. We conducted a search in Russian Science Citation Index and PubMed for a depth of 8 years. We included 22 articles, which contained the results of 35 independent cross-sectional studies, in our review. Meta-analysis of HIV recombinant forms prevalence was conducted in Open Meta-analyst with the use of Der Simonian & Laird method, arcsin transformation and correction factor for zero values. Subgroup analysis was used along with meta-regression (by date of collection). Pooled prevalence of HIV recombinant forms was 21.3% (95% CI 16.2–26.5) and was highly heterogeneous. Blood samples from 3,494 HIV patients living in various regions of the Russian Federation and CIS countries — Belarus, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Uzbekistan, Tajikistan, Armenia, Georgia — were examined. Among subtypes of HIV-1, the main share was occupied by subtype A — 75.6% (n = 2643), subtype B — 5.5% (n = 193), C — 0.8% (n = 31), G — 0.2% (n = 7), F — 0.14% (n = 5). Among the recombinant forms (n = 616), the fraction of CRF02_AG was 39.6% (n = 244), CRF02_AG/A was 32.9% (n = 203), CRF63_02A1 was 15.9% (n = 98), CRF03_AB — 5.2% (n = 32), CRF06_cpx — 2.1% (n = 13). Unique recombinant forms were 2.7% (n = 17), including URF63_A1 (2.5%). In Russia, the highest prevalence of recombinant forms of HIV-1 was registered in the Siberian Federal District (33.2% (95% CI 12.2–54.1), the lowest in the Northwest Federal District — 1.6% (95% CI 0.9–2.3). In the CIS countries, the highest prevalence of recombinant forms of HIV-1 is found in a subgroup of the Central Asian republics — Uzbekistan, Tajikistan, Kyrgyzstan, Kazakhstan — 51.7% (95% CI 38.5–64.9). The significant upward trend was shown with a meta-regression. Our review is the first such research in Russia and thus is of significant interest, but the result should be applied with caution due to high risk of publication bias as well as significant heterogeneity of our results.

Key words: HIV-1, prevalence, subtypes, genotypes, circulating recombinant forms.

Введение

В 2015 г. по глобальной оценке в мире было зарегистрировано 36,7 млн случаев ВИЧ-инфекции, из них 2,1 млн новых случаев [28]. Причиной пандемии ВИЧ является обширная циркуляция ВИЧ-1 группы М, включающей девять генетически различных подтипов, вместе с 88 циркулирующими рекомбинантными формами (circulating recombinant forms — CRF), которые совокупно отвечают за более чем 90% случаев ВИЧ-инфекции во всем мире [34].

В основе формирования рекомбинантных форм лежит двойное инфицирование больных, которое может происходить из-за одновременного заражения двумя и более гетерологичными штаммами (коинфекция) или последовательного инфицирования, в котором второе инфицирование происходит после сероконверсии к первичной инфекции (суперинфекция) [26, 27, 29].

На долю циркулирующих рекомбинантных форм приходилось около 17% всех случаев ВИЧ-инфекции в мире, причем за период 2000–2007 гг. их количество возросло на 50% [20]. Примерно 4% от всех случаев ВИЧ-инфекции в глобальном масштабе составляют уникальные рекомбинантные формы (Unique recombinant forms — URF), хотя в регионах, где одновременно циркулируют несколько подтипов и CRF, эта доля может увеличиваться и достигать 30% от всех новых случаев инфекции [38].

ВИЧ-1 обладает высокой степенью генетической изменчивости вследствие частых рекомбинаций и мутаций. Растущее глобальное генетическое разнообразие ВИЧ-1, связанное с циркуляцией различных подтипов ВИЧ и рекомбинантных форм, имеет важное клиническое значение (способность быстрого прогрессирования заболевания, высокая трансмиссивность, низкая чувствительность к антиретровирусной терапии, формирование специфических иммунных реакций), а также создает проблемы в лабораторной диагностике и проведении вирусологического мониторинга [20].

Молекулярно-эпидемиологическая характеристика современного эпидемического процесса ВИЧ-инфекции на территории России и стран СНГ свидетельствует о преобладании классического для РФ генетического варианта ВИЧ-1 субтипа А с одновременной тенденцией к увеличению в ряде регионов рекомбинантных форм вируса [3].

В ряде регионов мира наблюдается постепенное замещение первоначально доминировавших штаммов ВИЧ-1 новыми эпидемически значимыми CRF. Так, в Юго-Восточной Азии за период 2005–2011 гг. появились по меньшей мере пять новых рекомбинантных форм — CRF33_01B, CRF48_01B, CRF52_01B, CRF53_01B, CRF54_01B, образовавшихся в результате мутаций между субтипом В и CRF01_AE [21].

В мире наблюдается тенденция к стабилизации эпидемиологической ситуации и даже снижению заболеваемости населения ВИЧ-инфекцией в некоторых регионах. В Российской Федерации прилагаются усилия для предупреждения распространения ВИЧ-инфекции и стабилизации связанной с ней эпидемиологической ситуации, однако заболеваемость населения, особенно лиц трудоспособного возраста, а также смертность населения от ВИЧ-инфекции и заболеваний, связанных с ВИЧ, продолжают расти.

Различия в уровне заболеваемости и смертности населения в различных регионах РФ свидетельствуют о локальных особенностях эпидемиологических проявлений ВИЧ-инфекции, которые в немалой степени зависят от демографической структуры населения, социально-экономической, климато-географической характеристики региона.

Изучение распространенности субтипов ВИЧ на различных географических территориях может дать ценную информацию для выбора стратегии профилактики, а также совершенствования эпидемического надзора за ВИЧ-инфекцией.

За последние 7–8 лет в клинических центрах России было осуществлено генотипирование около 20 тыс. образцов ВИЧ, однако абсолютное большинство сведений о них не вышло за пределы лаборатории и недоступно для научного анализа [2].

Целью данного систематического обзора является исследование распространенности субтипов вируса иммунодефицита человека у больных ВИЧ-инфекцией в регионах России и стран Содружества независимых государств (СНГ).

Материалы и методы

Систематический обзор посвящен изучению распространенности рекомбинантных форм и субтипов ВИЧ среди больных ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и странах СНГ. Для обзора были отобраны публикации результатов поперечных исследований, в которых оценивалась распространенность различных субтипов ВИЧ среди больных на территории России и стран СНГ. Исключались публикации, в которых не было четкого описания изучаемой популяции, места и времени забора клинического материала.

Поиск проводился на глубину 8 лет по базам данных Russian Science Citation Index и PubMed с использованием ключевых слов: субтип, ВИЧ, рекомбинантный, генотип. Стратегия поиска в Russian Science Citation Index имела вид: (субтип*) & (ВИЧ) & (рекомбинант*) & (генотип*). Дополнительно проводился поиск в Google

Scholar и ручной поиск по библиографическим спискам из найденных обзорных статей. Дата последнего поиска — 1 мая 2017 года.

Найденные в базах данных записи оценивались на соответствие теме обзора по названию и абстракту независимо двумя авторами. После исключения дублирований для записей, признанных пригодными, были получены полнотекстовые публикации, которые более детально изучались так же независимо двумя авторами на предмет соответствия теме обзора, и, в случае положительного решения, из них извлекались данные. Для извлечения данных из публикаций использовалась форма, содержащая следующие сведения: авторы; дата публикации; изучаемая популяция (территория); дата забора материала; дизайн; размер выборки; число рекомбинантных штаммов ВИЧ. В случае если в одной публикации представлялись результаты, полученные в разных популяциях, то такие результаты учитывались отдельно.

Основные результаты исследований представлены в виде долей, поэтому данные были подвергнуты арксинус-трансформации, которая признана наиболее надежной для улучшения их статистических свойств [17]. В случае, когда результат исследования был нулевым (не было обнаружено рекомбинантных штаммов), то к такому результату применялся корректирующий коэффициент +0,5. Для обобщения результатов исследований использовалась модель случайных эффектов (метод Der Simonian & Laird) в приложении Open meta-analyst [19]. Для каждого метаанализа вычислялся критерий Хиггинса–Томпсона (I^2), при величине которого свыше 75% гетерогенность результатов исследований считалась высокой [30]. Были запланированы и проведены анализ в подгруппах (федеральные округа РФ и страны СНГ), а так же метарегрессия (регрессор — дата забора материала). Подгруппы федеральных округов РФ (Дальневосточный, Уральский, Северо-Западный, Центральный, Сибирский, Приволжский) составляли исследования, проведенные с участием населения регионов, входящих в состав соответствующего федерального округа РФ. Для стран СНГ были запланированы 3 подгруппы: Среднеазиатская, Закавказская и Европейская.

Не исключена значительная вероятность публикационного смещения ввиду относительно небольшого количества опубликованных данных по изучаемым регионам [2].

Результаты

Из 346 найденных в базах данных записей были исключены 297 (115 — дублирования; 182 — не соответствовали теме обзора); по остав-

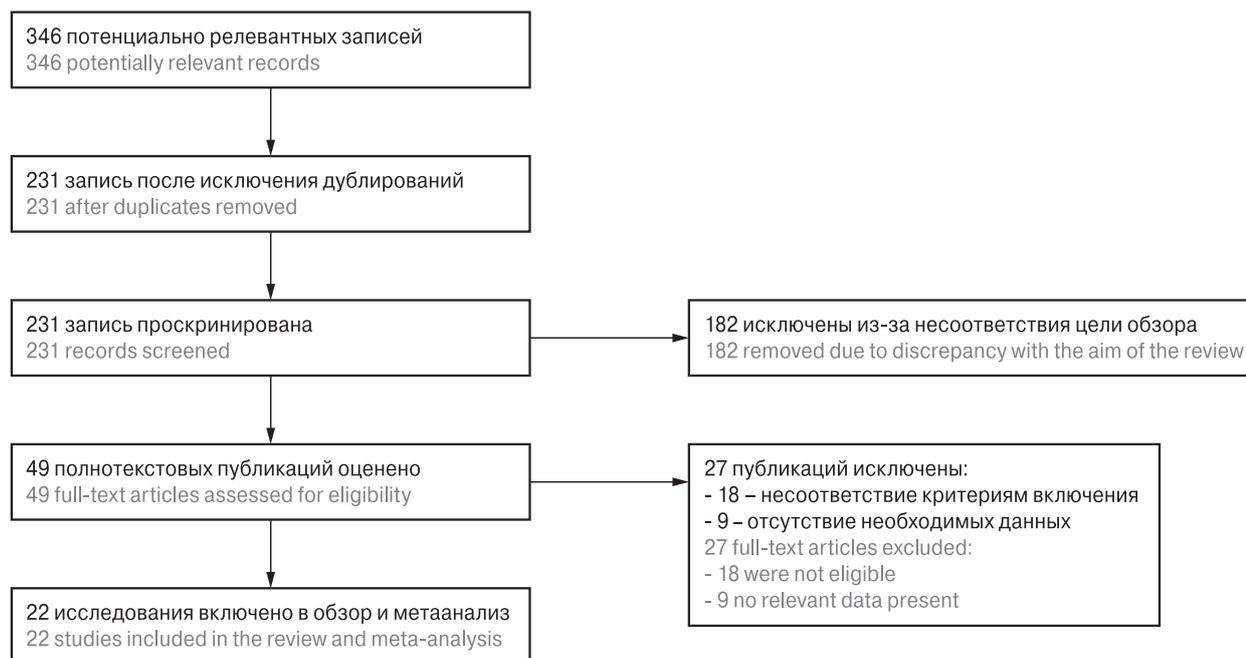


Рисунок 1. Поточковая диаграмма отбора исследований для обзора

Figure 1. Flow chart of the selection of studies for review

шимся 49 записям получены полнотекстовые статьи, из которых было исключено 27 (18 из-за несоответствия теме обзора; 9 из-за непригодности данных для анализа). Таким образом, в метаанализ были включены 22 исследования (рис. 1), характеристики которых представлены в таблице.

Обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 21,3% (95% ДИ 16,2–26,5) и характеризовалась высокой гетерогенностью ($I^2 = 98,9\%$, $p < 0,001$; рис. 2).

Анализ в подгруппах

В подгруппе Дальневосточного федерального округа (ДФО), представленной семью исследованиями [4, 7, 9, 10], обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 7,2% (95% ДИ 2,1–12,2) и характеризовалась высокой гетерогенностью ($I^2 = 83,1\%$, $p < 0,001$; рис. 2).

В подгруппе Уральского федерального округа (УФО), представленной тремя исследованиями [7, 25], обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 7,2% (95% ДИ 3,8–10,6) и характеризовалась нулевой гетерогенностью ($I^2 = 0\%$, $p = 0,480$; рис. 2).

В подгруппе Сибирского федерального округа (СФО), представленной девятью исследованиями [6, 7, 15, 26, 27], обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 33,2% (95% ДИ 12,2–54,1) и характеризовалась высокой гетерогенностью ($I^2 = 99,6\%$, $p < 0,001$; рис. 2).

Подгруппа Центрального федерального округа (ЦФО) была представлена единственным исследованием [13], что исключало проведение метаанализа в этой подгруппе.

В подгруппе Северо-Западного федерального округа (СЗФО), представленной тремя исследованиями [1, 14, 16], обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 1,6% (95% ДИ 0,9–2,3) и характеризовалась нулевой гетерогенностью ($I^2 = 0\%$, $p = 0,554$; рис. 2).

В подгруппе Приволжского федерального округа (ПФО), представленной двумя исследованиями [8, 13], обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 1,7% (95% ДИ 0,0–3,3) и характеризовалась нулевой гетерогенностью ($I^2 = 0\%$, $p = 0,653$; рис. 2).

Европейскую подгруппу стран СНГ составило единственное исследование в Белоруссии [5], что исключило проведение в ней метаанализа.

Среднеазиатскую подгруппу стран СНГ составили 7 исследований [11, 12, 18, 31, 33]. Обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 51,7% (95% ДИ 38,5–64,9) и характеризовалась высокой гетерогенностью ($I^2 = 86,1\%$, $p < 0,001$; рис. 2).

Закавказскую подгруппу стран СНГ (табл.) составили два исследования [23, 32]. Обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ составила 1,6% (95% ДИ 1,3–4,4) и характеризовалась умеренной гетерогенностью ($I^2 = 49,2\%$, $p = 0,160$; рис. 2).

Таблица. Характеристики исследований, включенных в систематический обзор и метаанализ
 Table. Characteristics of studies included in the systematic review and meta-analysis

Автор Author	Дата Date		Территория сбора материала Material collection area	Подгруппа Subgroup	Количество обследованных пациентов/выявлены рекомбинантные формы Number of examined patients/recombinant forms detected	Выявлены рекомбинантные формы ВИЧ-1 (абс.) Recombinant forms of HIV-1 (abs.)	Ссылка Source link
	публикации publication	сбора материала material collection					
Российская Федерация/Russian Federation							
Елисева В.С. Eliseeva V.S.	2015	2013–2014	Приморский край Primorsky Krai	ДФО FEFD	53/3	CRF02_AG (1), CRF AE (1), CRF B/A (1)	[4]
Казеннова Е.В. (1) Kazennova E.V. (1)	2013	1998–2007	Республика Якутия (Саха) The Republic of Yakutia (Sakha)	ДФО FEFD	45/0	–	[7]
Казеннова Е.В. (4) Kazennova E.V. (4)	2013	2005	Хабаровский край Khabarovsk territory	ДФО FEFD	34/0	–	[7]
Казеннова Е.В. (5) Kazennova E.V. (5)	2013	2005	Магаданская область Magadan Region	ДФО FEFD	23/1	CRF03_AB (1)	[7]
Казеннова Е.В. (8) Kazennova E.V. (8)	2014	2002–2012	Хабаровский край Khabarovsk territory	ДФО FEFD	34/0	–	[9]
Казеннова Е.В. (9) Kazennova E.V. (9)	2013	2002–2012	Благовещенск Blagoveshchensk	ДФО FEFD	40/2	CRF02_AG (2)	[9]
Котова В.О. Kotova V.O.	2016	2013–2015	ДФО FEFD	ДФО FEFD	140/26	CRF02_AG (22), CRF03_AB(1), CRF11_срх(1), CRF01_AE(2)	[10]
Gashnikova N.M. (4)	2016	2000–2015	Тюмень Tyumen	УФО UFD	72/4	CRF03_AB (1), CRF63_02A1(1), URF63_A1(2)	[25]
Казеннова Е.В. (2) Kazennova E.V.	2013	1995–2010	Ямало-Ненецкий АО The Yamalo-Nenets Autonomous District	УФО UFD	130/10	CRF03_AB (8), CRF AE (2)	[7]
Казеннова Е.В. (6) Kazennova E.V. (6)	2013	2006	Курганская область Kurgan region	УФО UFD	19/3	CRF03_AB (3),	[7]
Gashnikova N.M. (1)	2015	2013	Томск Tomsk	СФО SFD	61/58	CRF63_02A1(55), URF63_A1(3)	[26]
Gashnikova N.M.	2017	2015	Кемеровская область Kemerovo Region	СФО SFD	53/49	CRF63_02A1(38), URF63_A1(11)	[27]

Окончание таблицы. Характеристики исследований, включенных в систематический обзор и метаанализ

Table. Characteristics of studies included in the systematic review and meta-analysis (continued)

Автор Author	Дата Date		Территория сбора материала Material collection area	Подгруппа Subgroup	Количество обследованных пациентов/выявлены рекомбинантные формы Number of examined patients/recombinant forms detected	Выявлены рекомбинантные формы ВИЧ-1 (абс.) Recombinant forms of HIV-1 (abs.)	Ссылка Source link
	публикации publication	сбора материала material collection					
Казачинская А.Г. (1) Kazachinskaja A.G. (1)	2013	2010–2013	Новосибирск Novosibirsk	СФО SFD	250/194	CRF02_AG (5), CRF02_AG/A (189)	[6]
Казачинская А.Г. (2) Kazachinskaja A.G. (2)	2013	2010–2013	Чита Chita	СФО SFD	25/0	–	[6]
Казачинская А.Г. (3) Kazachinskaja A.G. (3)	2013	2010–2013	Новокузнецк Novokuznetsk	СФО SFD	29/6	CRF02_AG/A (6)	[6]
Казеннова Е.В. (10) Kazennova E.V. (10)	2013	2005–2009	Красноярский край Krasnoyarsk region	СФО SFD	99/0	–	[7]
Казеннова Е.В. (3) Kazennova E.V. (3)	2013	2005	Алтайский край Altai region	СФО SFD	69/0	–	[7]
Казеннова Е.В. (7) Kazennova E.V. (7)	2013	2006–2007	Республика Тыва Tyva Republic	СФО SFD	8/0	–	[7]
Пономарева О.А. Ponomareva O.A.	2016	2014–2016	Иркутская область Irkutsk region	СФО SFD	65/2	CRF02_AG (2),	[15]
Москалейчик Ф.Ф. (1) Moskalejchik F.F. (1)	2015	2008	Москва Moscow	ЦФО CFD	13/2	CRF02_AG (2),	[13]
Беляков Н.А. Beljakov N.A.	2012	2006–2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	СЗФО NFD	1055/18	CRF02_AG (2), CRF03_AB (5), CRF06_cpx (11)	[1]
Мусатов Б.В. Musatov B.V.	2013	2009–2011	Санкт-Петербург St. Petersburg	СЗФО NFD	68/0	–	[14]
Чурина М.А. Churina M.A.	2017	2014–2016	Великий Новгород Velikiy Novgorod	СЗФО NFD	25/1	CRF03_AB (1)	[16]
Казеннова Е.В. (11) Kazennova E.V. (11)	2015	2011–2013	ПФО VFD	ПФО VFD	236/4	CRF02_AG (1), CRF03_AB (3)	[8]
Москалейчик Ф.Ф. (2) Moskalejchik F.F. (2)	2015	2011	Пермь Perm	ПФО VFD	10/0	–	[13]

Автор Author	Дата Date		Территория сбора материала Material collection area	Подгруппа Subgroup	Количество обследованных пациентов/выявлены рекомбинантные формы Number of examined patients/ recombinant forms detected	Выявлены рекомбинантные формы ВИЧ-1 (абс.) Recombinant forms of HIV-1 (abs.)	Ссылка Source link
	публикации publication	сбора материала material collection					
Страны СНГ/CIS countries							
Еремин Е.Ф. Eremin E.F.	2012	2008–2011	Республика Беларусь Republic of Belarus	Европейская European	139/8	CRF02_AG (1), CRF03_AB (4) CRF06_cpx (2)	[5]
Веугер С.	2009	2004	Республика Таджикистан Republic of Tajikistan	Среднеазиатская Central Asian	20/10	CRF02_AG (9), URF02_A1 (1)	[18]
Ларовок I.	2017	2006–2015	Республика Узбекистан Republic of Uzbekistan	Среднеазиатская Central Asian	73/52	CRF02_AG (51), CRF63_02A1 (1)	[33]
Ларовок I.	2017	2006–2015	Республика Кыргызстан Republic of Kyrgyzstan	Среднеазиатская Central Asian	37/24	CRF02_AG (24)	[33]
Лага В.Ю. (1) Laga V.Ju. (1)	2012	2003–2009	Республика Кыргызстан Republic of Kyrgyzstan	Среднеазиатская Central Asian	22/6	CRF02_AG (6)	[11]
Лага В. (2) Laga V.Ju. (2)	2015	2009–2010	Республика Кыргызстан Republic of Kyrgyzstan	Среднеазиатская Central Asian	57/34	CRF02_AG (26), CRF02_AG/A (7), CRF03_AB (1)	[31]
Лаповок И.А. (1) Lapovok I.A. (1)	2015	2009	Республика Казахстан Republic of Kazakhstan	Среднеазиатская Central Asian	50/26	CRF02_AG (21), CRF03_AB (2), CRF63_02A1 (3)	[12]
Лаповок И.А. (2) Lapovok I.A. (2)	2015	2012–2013	Республика Казахстан Republic of Kazakhstan	Среднеазиатская Central Asian	155/54	CRF02_AG (51), CRF03_AB (1), CRF63_02A1 (1), CRF07_BC (1)	[12]
Dvali N.	2012	2006–2008	Республика Грузия Republic of Georgia	Закавказская Transcaucasian	153/1	CRF03_AB (1)	[23]
Laga V. (3)	2015	2009–2013	Республика Армения Republic of Armenia	Закавказская Transcaucasian	78/3	CRF02_AG (3)	[32]

ДФО — Дальневосточный федеральный округ, УФО — Уральский федеральный округ, СФО — Сибирский федеральный округ, ЦФО — Центральный федеральный округ, СЗФО — Северо-Западный федеральный округ, ПФО — Приволжский федеральный округ.
FEFD — Far Eastern Federal District, UFD — Ural Federal District, SFD — Siberian Federal District, CFD — Central Federal District, NFD — Northwestern Federal District, VFD — Volga Federal District.

Метарегрессия

Метарегрессия распространенности рекомбинантных штаммов ВИЧ в популяции РФ и стран СНГ по дате отбора материала имела вид $y = -83,101 + 0,041x$; все коэффициенты были статистически значимыми ($p < 0,001$; рис. 3).

Обсуждение

Это первый отечественный систематический обзор, направленный на обобщение существующих сведений о распространенности различных субтипов штаммов ВИЧ-1 в Российской Федерации и странах СНГ.

В обзоре были рассмотрены 22 релевантные публикации, а обобщенная распространенность рекомбинантных форм ВИЧ-1 составила 21,3% (95% ДИ 16,2–26,5). Полученная обобщенная оценка характеризовалась высокой гетерогенностью ($I^2 = 98,9\%$, $p < 0,001$), что может объясняться целым рядом факторов.

С одной стороны, сама популяция ВИЧ может быть статически или динамически неоднородной. Статическая неоднородность подразумевает существование региональных особенностей распределения штаммов ВИЧ по состоянию на определенный момент времени. Динамическая неоднородность предполагает

Исследования, ссылки Studies, references	Удельный вес, % (95% ДИ) Proportion, % (95% CI)	Рекомбинантных/Всего Recombinant/Total
Beyrer C. [18]	50,0% (28,1%; 71,9%)	10/20
Laga V. [31]	59,6% (46,9%; 72,4%)	34/57
Larovok I. [33]	64,9% (49,5%; 80,2%)	24/37
Larovok I. [33]	71,2% (60,8%; 81,6%)	52/73
Laga V. [11]	27,3% (8,7%; 45,9%)	6/22
Larovok I.A. [12]	52,0% (38,2%; 65,8%)	26/50
Larovok I.A. [12]	34,8% (27,3%; 42,3%)	54/155
Подгруппа среднеазиатских стран ($I^2 = 86,16\%$; $p < 0,001$)	51,7% (38,5%; 64,9%)	206/414
Subgroup Central Asian countries ($I^2 = 86,16\%$; $p < 0,001$)		
Dvali N. [23]	0,7% (-0,6%; 1,9%)	1/153
Laga V. [32]	3,8% (-0,4%; 8,1%)	3/78
Подгруппа закавказских стран ($I^2 = 49,32\%$; $p = 0,160$)	1,6% (-1,3%; 4,4%)	4/231
Subgroup Transcaucasian countries ($I^2 = 49,32\%$; $p = 0,160$)		
Gashnikova N. [25]	5,6% (0,3%; 10,8%)	4/72
Kazenova E.V. [7]	15,8% (-0,6%; 32,2%)	3/19
Kazenova E.V. [7]	7,7% (3,1%; 12,3%)	10/130
Подгруппа Уральского ФО ($I^2 = 0\%$; $p = 0,480$)	7,2% (3,8%; 10,6%)	17/221
Subgroup Ural Federal District ($I^2 = 0\%$; $p = 0,480$)		
Gashnikova N. M. [26]	95,1% (89,7%; 100,5%)	58/61
Gashnikova N.M. [27]	92,5% (85,3%; 99,6%)	49/53
Kazachinskaya A.G. [6]	77,6% (72,4%; 82,8%)	194/250
Kazachinskaya A.G. [6]	1,9% (-3,4%; 7,2%)	0/25
Kazachinskaya A.G. [6]	20,7% (5,9%; 35,4%)	6/29
Kazenova E.V. [7]	0,7% (-13,0%; 2,7%)	0/69
Kazenova E.V. [7]	0,5% (-0,9%; 1,9%)	0/99
Kazenova E.V. [7]	5,6% (-9,4%; 20,5%)	0/8
Ponomareva O.A. [15]	3,1% (-1,1%; 7,3%)	2/65
Подгруппа Сибирского ФО ($I^2 = 99,67\%$; $p < 0,001$)	33,2% (12,2%; 54,1%)	309/659
Subgroup Siberian Federal District ($I^2 = 99,67\%$; $p < 0,001$)		
Belyakov N.A. [1]	1,7% (0,9%; 2,5%)	18/1055
Musatov B.V. [14]	0,7% (-1,3%; 2,7%)	0/68
Churina M.A. [16]	4,0% (-3,7%; 11,7%)	1/25
Подгруппа Северо-Западного ФО ($I^2 = 0\%$; $p = 0,554$)	1,6% (0,9%; 2,3%)	19/1148
Subgroup Northwestern Federal District ($I^2 = 0\%$; $p = 0,554$)		
Eliseeva V.S. [4]	5,7% (-0,6%; 11,9%)	3/53
Kazenova E.V. [7]	4,3% (-4,0%; 12,7%)	1/23
Kazenova E.V. [7]	1,1% (-1,9%; 4,1%)	0/45
Kazenova E.V. [7]	1,4% (-2,5%; 54,0%)	0/34
Kazenova E.V. [9]	5,0% (-1,8%; 11,8%)	2/40
Kazenova E.V. [9]	17,0% (9,2%; 24,9%)	15/88
Kotova V.O. [10]	18,6% (12,1%; 25,0%)	26/140
Подгруппа Дальневосточного ФО ($I^2 = 83,15\%$; $p < 0,001$)	7,2% (2,1%; 12,2%)	47/423
Subgroup Far Eastern Federal District ($I^2 = 83,15\%$; $p < 0,001$)		
Yeryomin V.F. [5]	5,8% (1,9%; 9,6%)	8/139
Подгруппа европейских стран ($I^2 = n/a$; $p = n/a$)	5,8% (1,9%; 9,6%)	8/139
Subgroup European countries ($I^2 = n/a$; $p = n/a$)		
Kazenova E.V. [8]	1,7% (0,0%; 3,3%)	4/236
Moskaleychik F.F. [13]	4,5% (-7,8%; 16,9%)	0/10
Подгруппа Приволжского ФО ($I^2 = 0\%$; $p = 0,653$)	1,7% (0,0%; 3,3%)	4/246
Subgroup Volga Federal District ($I^2 = 0\%$; $p = 0,653$)		
Moskaleychik F.F. [13]	15,4% (-4,2%; 35,0%)	2/13
Подгруппа Центрального ФО ($I^2 = n/a$; $p = n/a$)	7,6% (-2,8%; 18,0%)	2/13
Subgroup Central Federal District ($I^2 = n/a$; $p = n/a$)		
Итого ($I^2 = 98,95\%$; $p < 0,001$)	21,3% (16,2%; 26,5%)	616/3494
Overall ($I^2 = 98,95\%$; $p < 0,001$)		

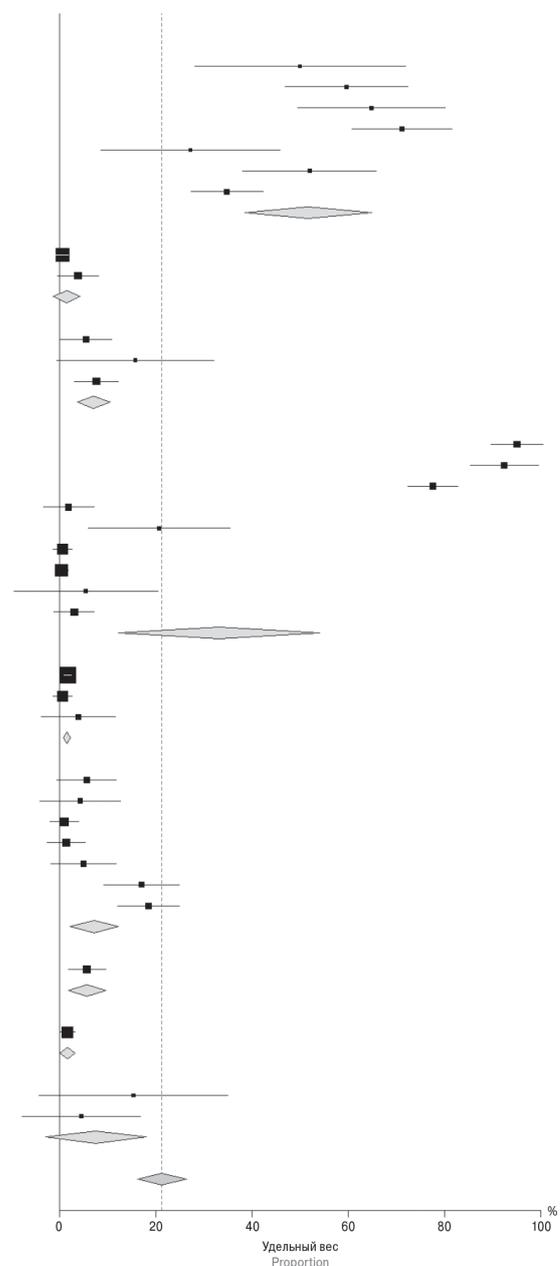


Рисунок 2. Распространенность рекомбинантных штаммов ВИЧ в популяции РФ и стран СНГ

Figure 2. The prevalence of recombinant HIV strains in the population of the Russian Federation and countries of the CIS

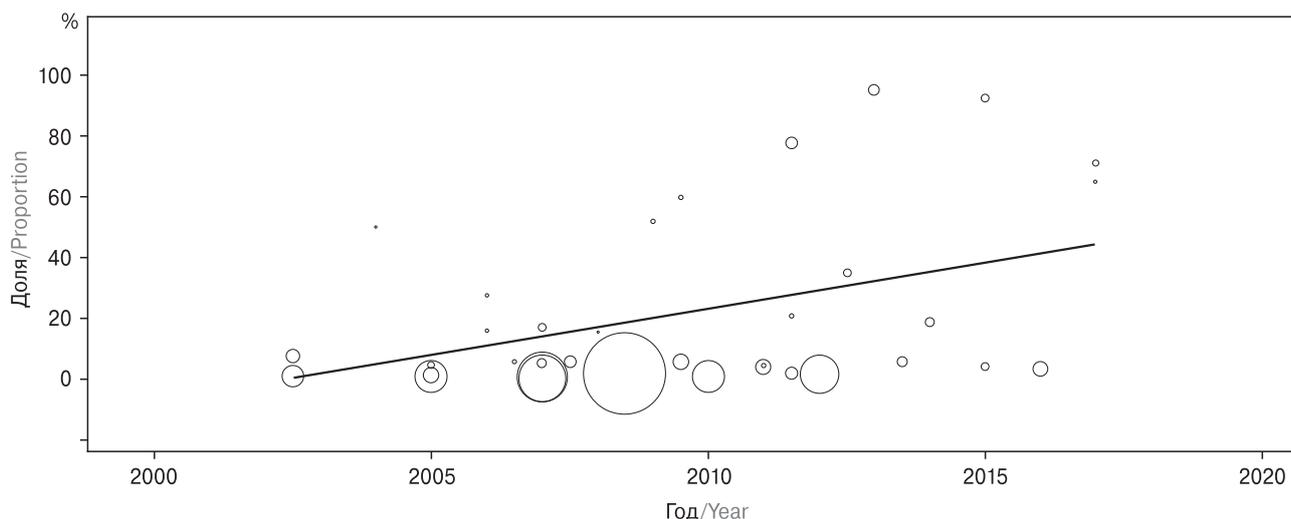


Рисунок 3. Метарегрессия распространенности рекомбинантных штаммов ВИЧ в популяции РФ и стран СНГ по дате отбора материала

Figure 3. Meta-regression of the prevalence of recombinant HIV strains in the population of the Russian Federation and countries of the CIS by the date of material selection

изменение популяции ВИЧ с течением времени. В пользу динамической неоднородности популяции ВИЧ говорит наличие значимого восходящего тренда метарегрессии, что не исключает существования и статической неоднородности.

С другой стороны, высокая гетерогенность результатов обобщенных исследований может объясняться наличием систематических ошибок в них: ни в одном исследовании описание методики отбора участников не дает достаточно оснований для исключения такой возможности. Различие в подходах к лабораторной диагностике не рассматривалось нами в качестве источника гетерогенности по той причине, что на территории Российской Федерации эти подходы едины.

В то же время любое повышение уровня знаний о динамике, закономерностях и особенностях распространения ВИЧ-1 в различных группах населения и географических регионах являются основой для оценки и разработки мер профилактики ВИЧ-инфекции [39].

Географическое распределение подтипов подвержено постоянным изменениям. Рекомбинантные формы вируса будут продолжать появляться до тех пор, пока различные подтипы ВИЧ-1 продолжают циркулировать между континентами, и имеются условия для их рекомбинации [37].

Мониторинг за циркуляцией субтипов ВИЧ в системе эпидемиологического надзора за ВИЧ-инфекцией может иметь значение для общественного здравоохранения в аспекте про-

гнозирования динамики заболеваемости населения, совершенствования профилактических мероприятий, оценки их эффективности и качества.

Рекомбинантные формы ВИЧ-1 могут быть более патогенными, обладают более высокими репликативными свойствами, значительной вирусной нагрузкой, обладают способностью вызывать более быстрое прогрессирование заболевания по сравнению с родительскими штаммами, что указывает на важность дальнейших исследований этих вариантов, а также связанных с ними возможных эпидемиологических последствий [13, 22, 36, 38]. Так в регионах мира с тенденцией к снижению заболеваемости населения ВИЧ-инфекцией преобладают основные субтипы ВИЧ-1, тогда как в регионах с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией наблюдается увеличение распространенности различных рекомбинантных форм возбудителя [35].

Таким образом, полученные нами данные могут представлять определенный интерес, но должны использоваться с осторожностью из-за высокой гетерогенности результатов обобщенных исследований. Обнаруженная нами тенденция к росту удельного веса рекомбинантных штаммов ВИЧ является неблагоприятным прогностическим признаком развития эпидемического процесса ВИЧ-инфекции, что требует переосмысления подходов к оценке и анализу качества мероприятий, направленных на профилактику и предупреждение распространения ВИЧ-инфекции.

Список литературы/References

1. Беляков Н.А., Розенталь В.В., Дементьева Н.Е., Виноградова Т.Н., Сизова Н.В. Моделирование и общие закономерности циркуляции субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4, № 2. С. 7–18. [Belyakov N.A., Rosental V.V., Dementeva N.E., Vinogradova T.M., Sizova N.V. Mathematical modelling and general trends of circulation of HIV subtypes and recombinant forms. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 7–18. (In Russ.)]
2. Бобкова М.Р. История и некоторые результаты генотипирования ВИЧ в России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 4. С. 7–16. [Bobkova M.R. History and some results of HIV genotyping in Russia. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 7–16. doi: 10.22328/2077-9828-2015-7-4-7-16 (In Russ.)]
3. Гашникова Н.М., Тотменин А.В., Саухат С.Р., Шемшур А.Б., Колпаков Д.С., Кучеренко И.Б., Матузкова А.Н., Козырев О.А. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика распространения ВИЧ-инфекции на юге России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5, № 4. С. 73–81. [Gashnikova N.M., Totmenin A.V., Sauhat S.R., Shemshura A.B., Kolpakov D.S., Kucherenko I.B., Matuzkova A.N., Kozzyrev O.A. Molecular epidemiological characteristics of the HIV-1 transmission in Southern Russia. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2013, vol. 5, no. 4, pp. 73–81. (In Russ.)]
4. Елисева В.С., Кругляк С.П., Скляр Л.Ф., Махно Е.С. Распространенность мутаций резистентности ВИЧ-1 к препаратам АРВТ в Приморском крае // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 2. С. 49–54. [Eliseeva V.S., Kruglyak S.P., Sklyar L.F., Smahno E. Prevalence of HIV-1 drug resistance mutations in Primorsky Region. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 2, pp. 49–54. doi: 10.22328/2077-9828-2015-7-2-49-55 (In Russ.)]
5. Еремич Е.Ф., Гасич Е.Л., Сосинович С.В., Суетнов О.Н., Грушко П.Н., Грушко Т.П., Ильенкова В.С., Горбунова Н.А., Амбарцумян Е.Г., Карпов И.А. Молекулярная эпидемиология ВИЧ/СПИД в Беларуси (2008–2011) // Здоровоохранение (Минск). 2012. № 1. С. 25–34. [Yeryomin V.F., Gasich E.L., Sosinovich S.V., Suyetnov O.N., Grushko P.N., Grushko T.P., Iliyenkova V.S., Gorbunova N.A., Karpov I.A. Molecular epidemiology of HIV/AIDS in Belarus (2008–2011). *Zdravookhraneniye (Minsk) = Public Health (Minsk)*, 2012, no. 1, pp. 25–34. (In Russ.)]
6. Казачинская А.Г., Богачев В.В., Барышев П.Б., Тотменин А.В., Чубарева Е.А., Ачигечева П.Ю., Золотарева И.В., Мирджамалова Ф.О., Топчин Ю.А., Черноусова Н.Я., Чичамкина Н.В., Абрамов В.А., Гашникова Н.М. Территориальные особенности распространения генетических вариантов ВИЧ-1 в Сибирском федеральном округе // Медицина и образование в Сибири. 2013. № 3. 12 с. [Kazachinskaya A.G., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Tommenin A.V., Chybareva E.A., Achigecheva P.Y., Zolotareva I.V., Mirdzhamalova F.O., Topchin Y.A., Chernousova N.Y., Chichamkina N.V., Abramov V.A., Gashnikova N.M. Territorial features of spread of HIV-1 genetic options in Siberian federal district. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Medicine and Education in Siberia*, 2013, no. 3, 12 p. (In Russ.)]
7. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Гришечкин А.Е., Лага В.Ю., Саламов Г.Г., Туманов А.С., Парыгина О.А., Рузаева Л.А., Грезина Л.А., Серкина Т.П., Кауфман О.А., Ооржак Н.Д., Лукашов В.В., Бобкова М.Р. Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России (2005–2010) // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 4. С. 28–35. [Kazennova E.V., Vasilyev A.V., Lapovok I.A., Grishechkin A.E., Laga V.Yu., Salamov G.G., Tumanov A.S., Parygina O.V., Ruzaeva L.A., Grezina L.A., Serkina T.P., Kaufman O.A., Oordjak N.D., Lukashov V.V., Bobkova M.R. HIV-1 genetic variants in the Asian Part of Russia: a study (2005–2010). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 28–35. (In Russ.)]
8. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лебедев А.В., Лага В.Ю., Глущенко Н.В., Зверев С.Я., Нистратова Ю.И., Зайцева Н.Н., Парфенова О.В., Герасимов В.В., Шошокин В.А., Бобкова М.Р. Анализ резистентности ВИЧ в Приволжском федеральном округе Российской Федерации // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 3. С. 56–66. [Kazennova E.V., Lapovok I.A., Lebedev A.V., Laga V.J., Glushchenko N.V., Zverev S.Y., Nistratova Y.I., Zaytseva N.N., Parfenova O.V., Gerasimov V.V., Shoshokin V.A., Bobkova M.R. Analysis of HIV drugs resistance in Privolzhskiy federal district of the Russian Federation. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 56–66. doi: 10.22328/2077-9828-2015-7-3-56-66 (In Russ.)]
9. Казеннова Е.В., Нешумаев Д.А., Рукавицын Д.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Ракчеева О.В., Васильев А.В., Туманов А.С., Воронцова Г.А., Кузнецова А.В., Лойфман Е.А., Старухина И.Н., Кустова О.И., Половица Н.В., Липская Н.А., Бобкова М.Р. Молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии ВИЧ-инфекции в Благовещенске и Хабаровске (Дальний Восток России) // Вопросы вирусологии. 2014. Т. 59, № 4. С. 31–36. [Kazennova E.V., Neshumaeв D.A., Rukavitsyn D.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Rakcheeva O.V., Vasilyev A.V., Tumanov A.S., Vorontsova G.A., Kuznetsova A.V., Loyfman E.A., Staruchina I.N., Kustova O.I., Polovica N.V., Lipskaya N.A., Bobkova M.R. Molecular epidemiological analysis of the HIV infection in the Blagoveshchensk and Khabarovsk Area (Russian Far East). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2014, vol. 59, no. 4, pp. 31–36. (In Russ.)]
10. Котова В.О., Балахонцева Л.А., Троценко О.Е. Анализ лекарственной устойчивости ВИЧ-1 в регионах Дальневосточного федерального округа // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. Т. 8, № 3. С. 53–58. [Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Trotsenko O.E. Analysis of HIV-1 drug resistance in regions of the Far Eastern federal district. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 53–58. doi: 10.22328/2077-9828-2016-8-3-53-58 (In Russ.)]
11. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева А., Асыбалиева Н., Бобкова М.Р. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 на территории Киргизии. Вопросы вирусологии. 2012. Т. 57, № 5. С. 26–32. [Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasilev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beisheeva N., Asybalieva N., Bobkova M.R. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, vol. 57, no. 5, pp. 26–32. (In Russ.)]

12. Лаповок И.А., Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Дзисюк Н.В., Утегенова А.К., Абишев А.Т., Тукеев М.С., Бобкова М.Р. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-1 в Казахстане в 2009–2013 гг. // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 4. С. 29–37. [Lapovok I.A., Laga V.Y., Kazennova E.V., Vasilyev A.V., Dzissyuk N.V., Utegenova A.K., Abishev A.T., Tukeev M.S., Bobkova M.R. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 in Kazakhstan in 2009–2013. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 29–37. (In Russ.)]
13. Москалейчик Ф.Ф., Лага В.Ю., Дельгадо Е., Вега И., Фернандес-Гарсия А., Перес-Альварес Л., Корнилаева Г.В., Пронин А.Ю., Жернов Ю.В., Томпсон М.М., Бобкова М.Р., Карамов Э.В. Стремительное распространение рекомбинантной формы CRF02_AG ВИЧ-1 на территории России и сопредельных стран // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, № 6. С. 14–19. [Moskaleychik F.F., Laga V.Yu., Delgado E., Vega Y., Fernandez-Garcia A., Perez-Alvarez L., Kornilaeva G.V., Pronin A.Yu., Zhernov Yu.V., Thomson M.M., Bobkova M.R., Karamov E.V. Rapid spread of the HIV-1 circular recombinant CRF02-AG in Russia and neighboring countries. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, vol. 60, no. 6, pp. 14–19. (In Russ.)]
14. Мусатов Б.В., Яковлев А.А., Тыргина Т.В., Ладная Н.Н. Прогностическое значение результатов генотипирования вирусов иммунодефицита человека, выделенных от больных первичной ВИЧ-инфекцией в 2009 и 2011 годах в Санкт-Петербурге // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2013. Сер. 11, вып. 1. С. 171–178. [Musatov V.B., Yakovlev A.A., Tirgina T.V., Ladnaya N.N. The prognostic significance of the results of genotyping human immunodeficiency virus isolated from the patients with primary HIV-infection in 2009 and 2011 in St. Petersburg. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta = Bulletin of St. Petersburg University*, 2013, ser. 11, iss. 1, pp. 171–178. (In Russ.)]
15. Понамарева О.А., Ревизор А.О., Круглова Е.А., Плотникова Ю.К., Наумова Е.С. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на территории Иркутской области // Лабораторная служба. 2016. № 1. С. 33–37. [Ponomareva O.A., Revizor A.O., Kruglova E.A., Plotnikova Yu.K., Naumova E.S. Genetic diversity of HIV-1 in Irkutsk region. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory service*, 2016, no. 1, pp. 33–37. doi: 10.17116/labs20165133-37 (In Russ.)]
16. Чурина М.А., Останкова Ю.В., Семенов А.В., Никитина Н.А., Росоловский А.П., Гребенкина Е.В., Ткаченко Т.Н., Жандармова Т.С., Трофимова Т.С., Асадуллаев М.Р., Беляков Н.А., Тотолян А.А. Молекулярная эпидемиология и фармакорезистентность ВИЧ-1 у пациентов с неэффективностью АРВТ в Великом Новгороде // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 82–92. [Churina M.A., Ostankova Y.V., Semenov A.V., Nikitina N.A., Rosolovsky A.P., Grebyonkina E.V., Tkachenko T.N., Zhandarmova T.A., Trofimova T.S., Asadullayev M.R., Belyakov N.A., Totolian A.A. HIV-1 drug-resistance and molecular epidemiology in patients with art failure in Veliky Novgorod. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 82–92. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-82-92 (In Russ.)]
17. Barendregt J.J., Doi S.A., Lee Y.Y., Norman R.E., Vos T. Meta-analysis of prevalence. *J. Epidemiol. Community Health*, 2013, no. 67, pp. 974–978. doi: 10.1136/jech-2013-203104
18. Beyrer C., Patel Z., Stachowiak J.A., Tishkova F.K., Stibich M.A., Eyzaguirre L.M., Carr J.K., Mogilnii V., Peryshkina A., Latypov A., Strathdee S.A. Characterization of the emerging HIV type 1 and HCV epidemics among injecting drug users in Dushanbe, Tajikistan. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2009, vol. 25, no. 9, pp. 853–860. doi: 10.1089/aid.2008.0206
19. Brodley C.E., Lau J., Schmid C.H. Open meta-analyst. URL: http://www.cebm.brown.edu/openmeta/downloads/open_meta_analyst_win8.zip (11.05.2018)
20. Castley A., Sawleshwarkar S., Varma R., Herring B., Thapa K., Dwyer D., Chibo D., Nguyen N., Hawke K., Ratcliff R., Garsia R., Kelleher A., Nolan D. A national study of the molecular epidemiology of HIV-1 in Australia 2005–2012. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 5: e0170601. doi: 10.1371/journal.pone.0170601
21. Chow W.Z., Takebe Y., Syafina N.E., Prakasa M.S., Chan K.G., Abed Al-Darraj H.A., Koh C., Kamarulzaman A., Tee K.K. A newly emerging HIV-1 recombinant lineage (CRF58_01B) disseminating among people who inject drugs in Malaysia. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 1: e85250. doi: 10.1371/journal.pone.0085250
22. Chu M., Zhang W., Zhang X., Jiang W., Huan X., Meng X., Zhu B., Yang Y., Tao Y., Tian T., Lu Y., Jiang L., Zhang L., Zhuang X. HIV-1 CRF01_AE strain is associated with faster HIV/AIDS progression in Jiangsu Province, China. *Sci. Rep.*, vol. 7, pp. 1570. doi: 10.1038/s41598-017-01858-2
23. Dvali N., Parker M.M., Chkhartishvili N., Sharvadze L., Gochitashvili N., Abutidze A., Karchava M., De Hovitz J.A., Tsertsvadze T. Characterization of HIV-1 subtypes and drug resistance mutations among individuals infected with HIV in Georgia. *J. Med. Virol.*, 2012, vol. 84, no. 7, pp. 1002–1008. doi: 10.1002/jmv.23269
24. Esbjornsson J., Mild M., Audelin A., Fonager J., Skar H., Jorgensen L., Liitsola K., Björkman P., Bratt G., Gisslén M., Sönnberg A., Nielsen C., Medstrand P., Albert J. HIV-1 transmission between MSM and heterosexuals, and increasing proportions of circulating recombinant forms in the Nordic Countries. *Virus Evol.*, 2016, vol. 2, iss. 1. doi: 10.1093/ve/vew010
25. Gashnikova N., Astakhova E., Gashnikova M., Bocharov E., Petrova S.V., Pun'ko O., Popkov A.V., Totmenin A.V. HIV-1 epidemiology, genetic diversity, and primary drug resistance in the Tyumen oblast, Russia. *BioMed Res. Int.*, 2016, 13 p. doi: 10.1155/2016/2496280
26. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., Ismailova T., Stepanova S.A., Chernov A.S., Mikheev V.N. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2015, vol. 31, no. 4, pp. 456–460. doi: 10.1089/aid.2014.0375
27. Gashnikova N.M., Zyryanova D.P., Astakhova E.M., Ivlev V.V., Gashnikova M.P., Moskaleva N.V., Aikin S.S., Bulatova T.N., Pustynnikov S.V., Bocharov E.F., Totmenin A.V. Predominance of CRF63_02A1 and multiple patterns of unique recombinant forms of CRF63_A1 among individuals with newly diagnosed HIV-1 infection in Kemerovo Oblast, Russia. *Arch. Virol.*, 2017, vol. 162, no. 2, pp. 379–390. doi: 10.1007/s00705-016-3120-4
28. Global AIDS Response Progress Reporting 2016. URL: https://aidsreportingtool.unaids.org/static/docs/GARPR_Guidelines_2016_EN.pdf (11.05.2018)
29. Gottlieb G.S., Nickle D.C., Jensen M.A., Wong K.G., Grobler J., Li F., Liu S.L., Rademeyer C., Learn G.H., Karim S.S., Williamson C., Corey L., Margolick J.B., Mullins J.I. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet*, 2004, vol. 363, pp. 619–622.

30. Higgins J.P., Thompson S.G., Deeks J.J., Altman D.G. Measuring inconsistency in meta-analysis. *BMJ*, 2003, vol. 327, pp. 557–560. doi: 10.1136/bmj.327.7414.557
31. Laga V., Lapovok I., Kazennova E., Ismailova A., Beisheeva N., Asybalieva N., Glushchenko N., Bobkova M. The genetic variability of HIV-1 in Kyrgyzstan: the spread of CRF02_AG and subtype A1 recombinants. *J. HIV/AIDS*, 2015, vol. 1 (2), 5 p. doi: 10.16966/jha.106
32. Laga V., Vasilyev A., Lapovok I., Grigoryan S., Papoyan A., Glushchenko N., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 subtype A1 dominates in Armenia. *Curr. HIV Res.*, 2015, vol. 13, iss. 3, pp. 219–225. doi: 10.2174/1570162X13666150407142834
33. Lapovok I., Laga V., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 integrase natural polymorphisms in viral variants circulating in FSU countries. *Curr. HIV Res.*, 2017, vol. 15, no. 5, pp. 318–326. doi: 10.2174/1570162X15666170815162052
34. Lau K.A., Wong J.L. Current trends of HIV recombination worldwide. *Infect. Dis. Rep.*, 2013, vol. 6, no. 5, suppl. 1: e4. doi: 10.4081/idr.2013.s1.e4
35. Neogi U., Häggblom A., Santacatterina M., Bratt A., Gisslén M., Albert J., Sonnerborg A. Temporal trends in the Swedish HIV-1 epidemic: increase in non-B subtypes and recombinant forms over three decades. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 6: e99390. doi: 10.1371/journal.pone.0099390
36. Palm A.A., Esbjornsson J., Mansson F., Kvist A., Isberg P.E., Biague A., da Silva Z.J., Jansson M., Norrgren H., Medstrand P. Faster progression to AIDS and AIDS-Related death among seroincident individuals infected with recombinant HIV-1 A3/CRF02_AG compared with sub-subtype A3. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 209, no. 5, pp. 721–728. doi: 10.1093/infdis/jit416
37. Peeters M., Delaporte E. Genetic diversity of HIV infection worldwide and its consequences. *Med. Trop. (Mars)*, 1999, vol. 59, no. 2, pp. 449–455.
38. Tebit D.M., Arts E.J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *Lancet Infect. Dis.*, 2011, vol. 11, no. 1, pp. 45–56. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70186-9
39. Wang X., Wu Y., Mao L., Xia W., Zhang W., Dai L., Mehta S.R., Wertheim J.O., Dong X., Zhang T., Wu H., Smith D.M. Targeting HIV prevention based on molecular epidemiology among deeply sampled subnetworks of men who have sex with men. *Clin. Infect. Dis.*, 2015, vol. 61, no. 9, pp. 1462–1468. doi: 10.1093/cid/civ526

Авторы:

Пасечник О.А., к.м.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия;
Блох А.И., ассистент кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Омский государственный медицинский университет, г. Омск, Россия.

Authors:

Pasechnik O.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation;
Blokh A.I., Assistant Professor, Department of Epidemiology, Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 25.07.2017
Отправлена на доработку 27.02.2018
Принята к печати 18.04.2018

Received 25.07.2017
Revision received 27.02.2018
Accepted 18.04.2018

СИНДРОМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Е.В. Боева^{1,2}, Н.А. Беляков^{1,2}

¹ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Антиретровирусная терапия (АРВТ), направленная на угнетение репликации ВИЧ, способствует росту количества CD4-лимфоцитов, а также частичному восстановлению или активации функции иммунной системы. Следствием является снижение частоты возникновения оппортунистических заболеваний, увеличение продолжительности и качества жизни людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ). Однако у некоторых пациентов с выраженной иммуносупрессией это может сопровождаться ухудшением состояния и рисками формирования синдрома восстановления иммунитета (СВИ), который проявляется в виде развития новых или ранее пролеченных оппортунистических, вторичных и обострением неинфекционных заболеваний на фоне вирусологически эффективной АРВТ. Частота развития СВИ колеблется в широких пределах, в случаях туберкулез-ассоциированного проявления может достигать 50%. Факторами риска развития СВИ являются низкое исходное количество CD4-лимфоцитов и высокое содержание РНК ВИЧ в крови, наличие оппортунистических инфекций в процессе начала АРВТ. В обзоре рассмотрены вопросы терминологии, другие возможные факторы риска развития синдрома, закономерности патологического процесса. Приведены эпидемиологическая статистика СВИ, патогенетические основы, варианты клинических и клинико-лабораторных проявлений осложнений. Рассмотрены критерии диагностики синдрома, а также необходимые условия для его возникновения. Особое внимание обращено к наиболее часто встречающимся оппортунистическим инфекциям, обуславливающих манифестацию СВИ, особенностям и полиморфизму клинических проявлений и профилактике их возникновения. На данный момент наблюдается учащение выявления ВИЧ-инфекции на поздних стадиях. Освещены лабораторные и клинические различия проявлений синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и СВИ. В виду размытости диагностических критериев, в РФ специалисты редко выставляют СВИ в клинический или патологический диагнозы, поэтому проследить частоту встречаемости данного состояния достаточно сложно. Систематизированы клинические и лабораторные проявления, что позволяет на основании их совокупности формулировать этот диагноз. Профилактика СВИ заключается в разумном назначении антиретровирусных препаратов (АРВП). Необходимо проведение качественной и своевременной диагностики сопутствующих заболеваний инфекционной и неинфекционной природы перед началом АРВТ и в процессе лечения, назначение эффективной этиотропной терапии оппортунистических и вторичных инфекций. В целях улучшения прогноза течения ВИЧ-инфекции, предпочтительно раннее начало АРВТ при устойчивых показателях CD4-лимфоцитов и низком содержании РНК ВИЧ в крови.

Ключевые слова: ВИЧ, антиретровирусная терапия, иммунитет, оппортунистические заболевания, осложнения, синдром восстановления иммунитета.

Адрес для переписки:

Боева Екатерина Валериевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 911 792-91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

Contacts:

Ekaterina V. Boeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 911 792-91-94.
E-mail: kathrine.boeva@gmail.com

Библиографическое описание:

Боева Е.В., Беляков Н.А. Синдром восстановления иммунитета //
Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 139–149. doi: 10.15789/2220-
7619-2018-2-139-149

Citation:

Boeva E.V., Belyakov N.A. Immune reconstitution inflammatory syndrome //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018,
vol. 8, no. 2, pp. 139–149. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-139-149

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 17-54-30014.

© Боева Е.В., Беляков Н.А., 2018

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-139-149>

IMMUNE RECONSTITUTION INFLAMMATORY SYNDROME IN HIV INFECTION

Boeva E.V.^{a,b}, Belyakov N.A.^{a,b}

^a Pavlov First State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Paster Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Antiretroviral therapy (ART) leads to suppression of HIV replication, contributes to increase in the number of CD4-lymphocytes count and partial restoration or activation of the immune system. The consequence is a reduction of incidence of opportunistic diseases, increase in the duration and quality of life of people living with HIV (PLHIV). However, in some patients with severe immunosuppression, this may be accompanied by a worsening of the condition and risks of formation of the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS), which manifests itself in the development of new or previously treated opportunistic, secondary and exacerbating non-infectious diseases against a virologically effective ART. The frequency of the development of IRIS varies widely, in cases of tuberculosis-associated manifestation it can reach 50%. Risk factors for the development of IRIS are low initial CD4-lymphocyte count and a high load of HIV RNA in the blood, the presence of opportunistic infections during the initiation of ART. Discussed terminology issues, other possible risk factors for the development of the syndrome, regularities of the pathological process are considered. Epidemiological statistics of IRIS, pathogenetic bases, variants of clinical and laboratory manifestations of complications are given. The criteria for diagnosis of the syndrome, as well as the necessary conditions for its occurrence, are considered. Particular attention is paid to the most common opportunistic infections that cause the manifestation of IRIS, the peculiarities and polymorphism of clinical manifestations and the prevention of their occurrence. Currently, there is an increasing incidence of HIV infection in the late stages. Laboratory and clinical differences in the manifestations of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and IRIS have been sanctified. In view of the blurring of the diagnostic criteria, in the Russian Federation specialists rarely expose IRIS to clinical or pathological diagnoses, therefore it is rather difficult to trace the frequency of occurrence of this condition. Clinical and laboratory manifestations are systematized, which allows to formulate this diagnosis on the basis of their totality. Prevention of IRIS is the prudent prescription of antiretroviral drugs. It is necessary to conduct a qualitative and timely diagnosis of concomitant diseases of infectious and non-infectious nature before the initiation of ART and during treatment, the appointment of effective etiotropic therapy for opportunistic and secondary infections. In order to improve the prognosis of HIV infection, preferably early onset of ART with stable CD4-lymphocyte counts and low HIV RNA levels in the blood.

Key words: HIV, antiretroviral therapy, immunity, opportunistic diseases complications, immune reconstitution inflammatory syndrome.

Термины и определение

Синдром восстановления иммунитета (СВИ) [синдром восстановления иммунной системы (СВИС), синдром иммунной реконституции (СИР), воспалительный синдром восстановления иммунной системы (ВСВИС), Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS), Immune restoration disease (IRD), Immune reconstitution syndrome (IRS)] развивается у ВИЧ-инфицированных пациентов с выраженной иммуносупрессией, сопровождается прогрессирующим ухудшением состояния, развитием новых или ранее пролеченных оппортунистических инфекций, вторичных и соматических заболеваний на фоне эффективной антиретровирусной терапии (АРВТ) в течении первых трех месяцев лечения [43, 44, 47].

Начало АРВТ у большинства ВИЧ-инфицированных пациентов приводит к угнетению репликации вируса, увеличению пула CD4-лимфоцитов и восстановлению протективной функции иммунной системы, в следствии чего снижается частота возникновения оппортунистических инфекций (ОИ) [46]. На этом построе-

на современная стратегия лечения больных с ВИЧ-инфекцией [5, 7].

Однако, у многих пациентов, начавших АРВТ, дисрегуляция иммунитета приводит к развитию СВИ. Отличительный признак синдрома — парадоксальное ухудшение на фоне уже ранее диагностированного инфекционного заболевания или развитие новой инфекционной патологии вскоре после начала терапии [20, 45].

Частота развития СВИ у пациентов, начавших АРВТ, составляет 10–32% [38, 41, 45, 47]. По некоторым данным частота развития туберкулез-ассоциированного СВИ достигает 45–50% [13]. Такой широкий процентный диапазон отчасти связан с:

- отсутствием общепринятых критериев и сложностями в диагностике;
- началом и составом схемы АРВТ;
- эпидемической обстановкой по туберкулезу;
- степени приверженностью больных к АРВТ;
- социальными условиями пациента и др. [30, 37].

Факторы риска

Наличие оппортунистической инфекции в процессе начала АРВТ является достоверным фактором риска в развитии СВИ. Ранее диагностированные у пациента диссеминированные заболевания, такие как туберкулез и криптококкоз, до начала АРВТ значительно повышают риск развития СВИ. Крайне низкое исходное количество CD4-лимфоцитов (менее 50 кл/мкл) также способствует развитию тяжелых ОИ. Однако было отмечено, что формирование СВИ может происходить на фоне более высокого содержания CD4-лимфоцитов. Из этого следует, что не только низкий уровень CD4-лимфоцитов, но и несовершенство функционального статуса иммунной системы у ВИЧ-инфицированных пациентов провоцирует манифестацию синдрома [30, 31, 44].

Нельзя исключить генетическую предрасположенность в развитии СВИ у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Синдром чаще встречается у мужчин и у лиц молодого возраста. Обсуждаются режимы АРВТ как факторы риска, связанные с отдельными группами препаратов [44].

Факторы, предрасполагающие к СВИ:

- продвинутая стадия заболевания (4Б, 4В);
- выраженная иммуносупрессия, снижение CD4-лимфоцитов в крови ниже 200 кл/мкл;
- большое количество РКН ВИЧ в крови (выше 10^5);
- наличие оппортунистических и СПИД-ассоциированных инфекций, включая туберкулез;
- недостаточный интервал времени между лечением оппортунистических инфекций, вторичных заболеваний и началом АРВТ;
- наркопотребление, алкоголизм;
- асоциальный образ жизни.

Патогенез СВИ

Иммунопатогенез синдрома до конца неясен и требует дополнительных исследований. Предполагается, что триггерным фактором развития СВИ является дисрегуляция иммунного ответа на воздействие антигенных стимулов на фоне начала АРВТ. Патофизиология процесса предполагает вовлечение нескольких факторов, таких как восстановление числа иммунокомпетентных клеток и функциональное перераспределение лимфоцитов, дефект в регуляторной функции, изменения Th-клеточного профиля, высокий уровень РНК ВИЧ, а также генетическая предрасположенность организма [32].

Во многом иммунопатогенез СВИ определяется наличием конкретного патогена. Развитие синдрома ассоциировано с CD4Th1-

опосредованным иммунным ответом с вовлечением в процесс CD4- и CD8-эффекторных клеток. Формирование СВИ связано с несбалансированной иммунной реконституцией эффекторных и регуляторных Т-клеток. Существуют два типа клеток, играющих важную роль в развитии синдрома: провоспалительные Th17-клетки и регуляторные Т-клетки. В норме Т-регуляторные Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ клетки поддерживают физиологическое равновесие и Т-клеточный гомеостаз, а также предотвращают избыточный воспалительный ответ. В процессе течения иммунной реконституции уменьшается количество и угнетается функция Т-регуляторных лимфоцитов, что приводит к несостоятельности их супрессивной активности и к высвобождению провоспалительных цитокинов [48]. Предполагается, что значительный вклад в развитие СВИ приносят макрофаги и натуральные киллеры (НК-клетки), экспрессирующие на поверхность специфические молекулы, способные усиливать или подавлять их функцию. Особое место НК отводится в патогенезе герпес-ассоциированного СВИ. В свою очередь, нарушение активности макрофагов играет роль в развитии туберкулез-ассоциированного СВИ [17].

Парадоксальный ТБ-ассоциированный СВИ связан с активностью интерлейкинов (IL-4, IL-6, IL-7, IFN γ и TNF α). В исследовании Haddow et al. [34] отмечен высокий уровень IFN γ и СРБ в плазме крови у пациентов с развившимся СВИ на фоне латентно протекавшего туберкулеза и низкий уровень биомаркеров моноцитов и Т-клеточной активности у пациентом с парадоксальным ТБ-СВИ. Схожим течением обладает криптококк-ассоциированный СВИ, провоцирующий выработку провоспалительных цитокинов, включая Th1-цитокины. В проспективном исследовании Boulware et al. [27] отмечен повышенный уровень СРБ, IL-4 и IL-17 и низкий показатель эндотелиального фактора роста, гранулоцит-колониестимулирующего фактора и TNF α у пациентов до начала АРВТ и с последующим развитием ЦМВ-СВИ.

Не исключено, что развитие СВИ связано с наличием определенного лейкоцитарного антигенного профиля (HLA) и полиморфизмом генов регуляции цитокинов. ЦМВ-СВИ чаще развивается у носителей гена HLA-B44 и гаплотипа HLA-A2, B44, DR4. У пациентов с микобактериальным СВИ реже встречаются TNF α — 308*2 и IL-6 — 174*G. Эти аллели определяют низкую продукцию цитокинов. Наблюдения показали важную роль IL-12 в прогрессировании ЦМВ-СВИ, IL-6 и TNF α в развитии микобактериального СВИ [32, 43]. Основные процессы формирования СВИ представлены на рисунке 1.

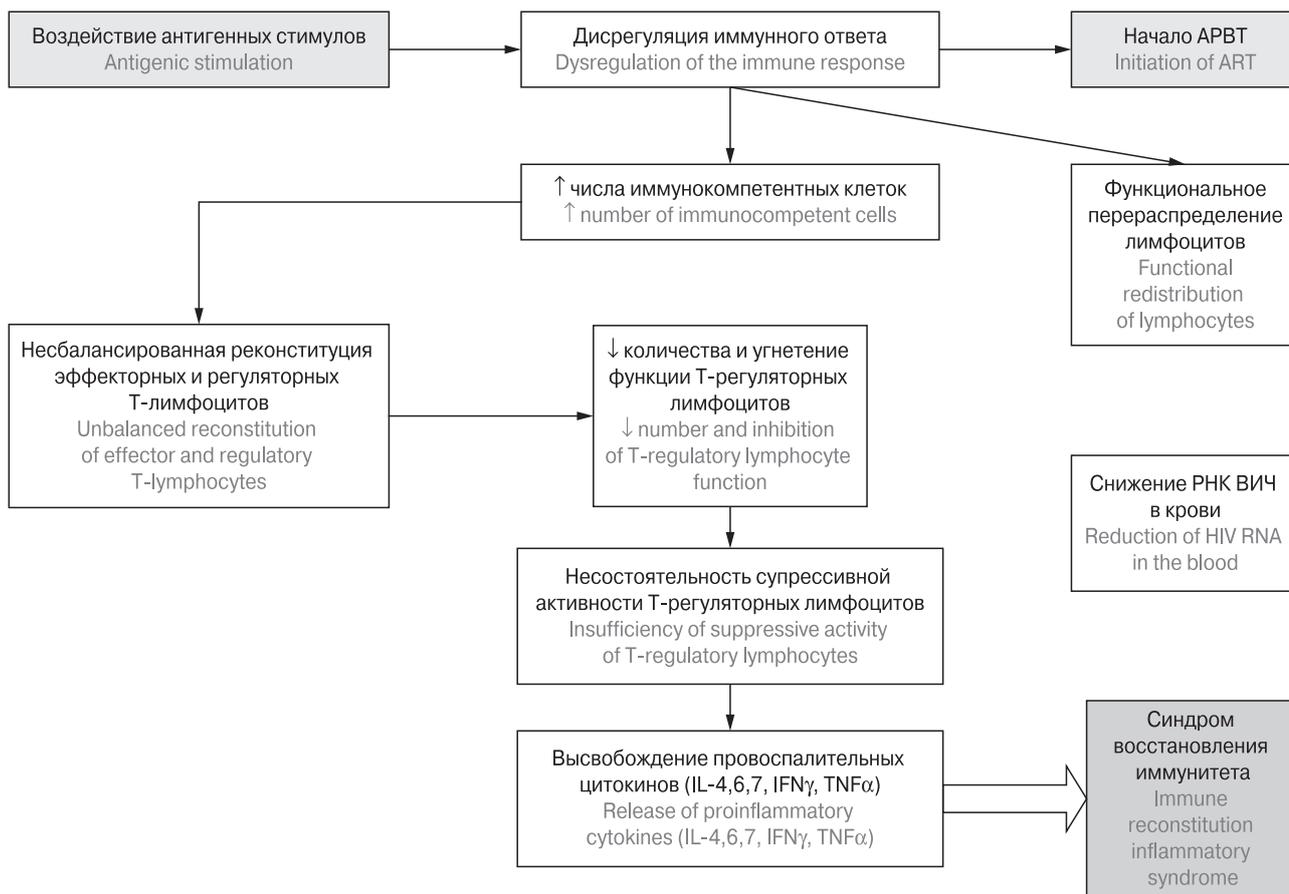


Рисунок 1. Основные процессы формирования синдрома восстановления иммунитета

Figure 1. The main processes of the formation of the immune reconstitution syndrome

Выявление и диагностика СВИ

Анализ отечественной литературы и клинических материалов, накопленных с момента повсеместного применения АРВТ, сопоставления их с материалом аутопсий людей, умерших на фоне ВИЧ, свидетельствует о том, что диагноз СВИ ставится достаточно редко. Это расходится с ростом летальных исходов на фоне АРВТ на продвинутых стадиях ВИЧ-инфекции, в том числе от туберкулеза и оппортунистических инфекций [1, 7, 11, 48].

В большинстве случаев гибель наступает в течении первого года или нескольких месяцев с начала АРВТ [7, 11, 14, 16, 19, 20, 48]. При анализе литературы возникает по меньшей мере несколько закономерных вопросов:

- терапия была неэффективной из-за схем лечения и препаратов;
- пациенты были в необратимом состоянии до начала АРВТ;
- развивался СВИ, но он не был выставлен, поскольку врачи, имея достаточную информированность в этом вопросе, не считают необходимым выходить за профессиональные стереотипы.

Скорее всего упомянутые вопросы имели свое присутствие и ретроспективно трудно

определились с каждым случаем в отдельности. Вероятно, по этой причине мы не имеем отечественной статистики и ссылаемся на наблюдения зарубежных коллег.

Исходя из общих представлений патогенеза СВИ, его можно рассматривать как фармакологически опосредованное острое воспаление, развивающееся на фоне подавленной активности иммунитета. При этом существуют определенные условия и клинические проявления, завершающиеся либо выздоровлением, либо гибелью от оппортунистических, вторичных инфекций и заболеваний.

В настоящее время существуют общие взгляды и особенности в трактовке СВИ. Рассмотрим варианты наиболее частых клинических проявлений, далее лабораторное подтверждение и предрасполагающие к СВИ факторы.

Варианты клинических проявлений СВИ:

- обострение вялотекущего заболевания после назначения АРВТ;
- манифестация ранее пролеченных заболеваний после начала АРВТ;
- проявление новых заболеваний с началом АРВТ;
- гибель в течении первых месяцев после начала АРВТ.

Клинико-лабораторные проявления СВИ:

- резкое ухудшение общего состояния с началом АРВТ;
- подъем температуры тела;
- быстрое восстановление CD4-лимфоцитов в крови;
- снижение количества РНК ВИЧ;
- признаки острого воспалительного процесса;
- рост противовоспалительных цитокинов.

Клинические состояния, имитирующие проявления СВИ:

- активация клинических проявлений без активации иммунитета;
- резистентность ВИЧ к антиретровирусным препаратам;
- скрытое прекращение АРВТ больным;
- суперинфекция ВИЧ с устойчивой резистентностью;
- действие внешних факторов, отягощающих течение ВИЧ-инфекции (ПАВ, токсины, несовместимые препараты и др.);
- ухудшение клинической картины, совпадающее с назначением АРВТ по времени, но не по причинам.

На данный момент не существует абсолютных диагностических критериев СВИ. Это связано с полиэтиологичностью синдрома, нередко спровоцированного несколькими патогенетическими факторами.

Ниже представлены критерии диагностики СВИ, разработанные Френчем (2004) и Робертсоном (2006) [31, 37, 44].

Критерии диагностики СВИ по Френчу (2004)

Диагноз СВИ является определенным при наличии у пациента 2 больших критериев (А+Б) или 1 большого и 2 малых критериев.

Большие критерии:

А. Парадоксальное (атипичное) развитие оппортунистических инфекций и опухолей у пациентов с эффективной (иммунологически и вирусологически) АРВТ, проявляющееся в виде:

- локализованного заболевания;
- избыточной воспалительной реакцией;
- атипичной воспалительной реакцией в пораженных тканях;
- прогрессирования органной дисфункции и ухудшения течения ранее существующих заболеваний после достоверного клинического улучшения на фоне этиологического лечения перед началом АРВТ, исключая токсическое действие препаратов.

Б. Значительное снижение уровня вирусной нагрузки ВИЧ (РНК ВИЧ) более чем в 10 раз от первоначального количества.

Малые критерии:

- повышение количества CD4-лимфоцитов в крови после начала АРВТ;

- усиление иммунного ответа;
- спонтанное излечение заболевания в условиях продолжения АРВТ.

*Критерии диагностики СВИ по Робертсону (2006)**Обязательные критерии:*

- ухудшение течения воспалительных заболеваний;
- временная связь с началом АРВТ;
- отличие клинических симптомов от ранее выявленных и перенесенных заболеваний или типичное течение перенесенного инфекционного заболевания до начала АРВТ;
- значительное снижение уровня вирусной нагрузки ВИЧ (РНК ВИЧ) более чем в 10 раз от первоначальной концентрации.

Вспомогательные критерии:

- повышение уровня CD4-лимфоцитов в крови после начала АРВТ (> 25 кл/мкл);
- подтвержденное по материалам биопсии гранулематозное воспаление или нетипичная избыточная воспалительная реакция в тканях.

Следует обратить внимание на временную связь между началом АРВТ и возникновением заболевания, симптомы которого развиваются в течении первых 3 месяцев лечения ВИЧ-инфекции. Необходимы условия: клеточное восстановление иммунной системы и вирусологическая эффективность АРВТ, на фоне которого прогрессирует воспалительный процесс. Несмотря на то, что повышение количества CD4-лимфоцитов — неотъемлемое проявление СВИ, по мнению М.А. French et al. (2004), это не основной критерий диагностики. Восстановление числа CD4-лимфоцитов в крови не всегда является полноценным показателем иммунного статуса. В свою очередь, значительное снижение РНК ВИЧ в плазме является не менее важным индикатором развивающегося СВИ [31, 37].

Инфекции и СВИ

Синдром восстановления иммунитета на фоне АРВТ связан с активацией микобактериальных, вирусных, грибковых и паразитарных оппортунистических инфекций. Воспалительный ответ иммунной системы может формироваться не только к жизнеспособным или нежизнеспособным патогенам, но и к резидуальным антигенам. Различают 2 варианта манифестации СВИ:

а) развитие воспалительного ответа на латентное, клинически не проявляющее себя до начала АРВТ заболевание;

б) «парадоксальное» обострение ранее диагностированного и пролеченного заболевания на фоне начала АРВТ [13].

Следует учитывать, что альтернативной причиной развития оппортунистических инфек-

ций и ухудшения состояния может быть низкая приверженность пациента к АРВТ и развитие лекарственной резистентности [37].

СВИ и туберкулез. Инфицирование *Mycobacterium tuberculosis* является наиболее распространенной причиной развития СВИ (8–50%) [12, 13, 15].

Различают следующие факторы риска развития ТБ-ассоциированного СВИ: короткий временной промежуток между началом противотуберкулезного лечения и АРВТ, низкий исходный уровень CD4-лимфоцитов, высокое содержание РНК ВИЧ в плазме крови, стремительное снижение РНК ВИЧ на фоне АРВТ. Большинство случаев развития ТБ-ассоциированного СВИ наблюдается в первые 2–3 недели от начала АРВТ, клинически это сопровождается ухудшением состояния пациента или появлением новых клинических и радиологических симптомов, таких как лихорадка, увеличение лимфатических узлов и появление свежих инфильтратов. ТБ-СВИ может также проявляться висцеральным и кожным абсцедированием, поражением ЦНС, перикардиальным выпотом, развитием острого респираторного дистресс-синдрома, дыхательной недостаточностью и острой почечной недостаточностью [3, 8, 12].

На данный момент рекомендуется присоединять АРВТ через 2–8 недель после начала лечения туберкулеза у пациентов с количеством CD4-лимфоцитов менее 200 кл/мкл [5, 6, 9, 10, 15].

***Mycobacterium avium complex (MAC)*.** Частота встречаемости MAC-ассоциированного СВИ около 3,5% среди пациентов с исходным уровнем CD4-лимфоцитов менее 100 кл/мкл. MAC-ассоциированный СВИ развивается у пациентов с выраженной иммуносупрессией на фоне успешной АРВТ. Клинически синдром проявляется в первые 2–8 недель после начала АРВТ в виде лихорадки, увеличения лимфатических узлов, сопровождающегося болезненностью (69%). MAC-ассоциированный СВИ, как правило, протекает в локализованной форме, с возможным вовлечением в патологический процесс мягких тканей и опорно-двигательного аппарата [38, 42].

Криптококк-ассоциированный СВИ протекает в виде менингита, лимфаденита, пневмонита и локализованных абсцессов. СВИ с вовлечением ЦНС диагностируют в 1,5% случаев у пациентов, начавших АРВТ, при уровне CD4-лимфоцитов менее 200 кл/мкл. Как правило, он манифестирует в парадоксальной форме. Примерно 60% случаев СВИ развивается после первого месяца эффективной АРВТ. Специфические факторы развития криптококк-ассоциированного СВИ включают в себя: назначение АРВТ в кратчайший промежуток времени после начала лечения

криптококковой инфекции низкое число CD4-лимфоцитов (менее 100 кл/мкл); высокое исходное содержание РНК ВИЧ в плазме крови; высокий титр криптококкового антигена; лейкоцитоз и повышение уровня глюкозы в крови [26, 40, 48].

Пневмоцистная пневмония (ПЦП) является одной из наиболее часто встречающихся оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов. Ухудшение состояния чаще происходит в первые 2–3 недели с момента начала АРВТ и проявляется возвратной лихорадкой, нарастающей гипоксией, свежими легочными инфильтратами на рентгенограмме. Факторы риска развития ПЦП-СВИ: тяжесть течения болезни и развитие гипоксии ($PaO_2 < 70$ mmHg), раннее начало АРВТ и проведение гормональной терапии ПЦП до начала АРВТ [33, 36].

Вирусные инфекции. Ульцерация кожи и слизистых оболочек, вызванные вирусом простого герпеса, и активация вируса папилломы человека (ВПЧ) часто являются проявлением СВИ. Опоясывающий герпес при СВИ, как правило, затрагивает не более одной анатомической области [5, 18, 29]. Нередко СВИ проявляется в виде ретинитов, витреитов и увеитов цитомегаловирусной (ЦМВ) этиологии. Зарегистрированы случаи развития прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии (ПМЛ) на фоне начала АРВТ, протекающей латентно или парадоксально [24, 46].

СВИ и онкология

Учитывая этиологическую связь саркомы Капоши и неходжкинской лимфомы (НХЛ) с вирусными инфекциями (герпесвирус 8 типа и вирус Эпштейна–Барр), возможно их возникновение или ухудшение течения опухолевого процесса на фоне начала АРВТ. Обычно инициация АРВТ снижает частоту возникновения саркомы Капоши и НХЛ, однако, отмечены случаи развития саркомы вскоре после начала АРВТ. В последних исследованиях было показано, что СВИ может транзиторно увеличивать риск возникновения саркомы Капоши и НХЛ у ВИЧ-инфицированных пациентов, и своевременное начало АРВТ — лучшая стратегия по предотвращению развития этих онкологических заболеваний [35, 39].

Аутоиммунные заболевания и СВИ

На фоне начала АРВТ у некоторых пациентов могут развиваться и аутоиммунные заболевания, такие как болезнь Грейвса и саркоидоз, выступающие в качестве проявлений СВИ. В таких случаях необходимо производить диф-

ференциальную диагностику между саркоидозом и микобактериальным компонентом СВИ [2, 22, 28, 30].

Течение и прогноз

Зарубежные авторы отмечают, что прогноз при развитии СВИ относительно благоприятный [41, 47, 48]. Отечественные исследователи, как было отмечено выше, неблагоприятные исходы в начале АРВТ и развитие оппортунистических инфекций и туберкулеза связывают с возможным проявлением СВИ [1, 4, 7, 8, 12, 25]. Летальность на фоне СВИ в первую очередь связана с особенностями патогена и макроорганизма. Худший прогноз для жизни имеют пациенты с поражением ЦНС, вызванными *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* [23, 48].

В настоящее время необходимо учитывать различия в возможностях и тактике ведения больных с ВИЧ-инфекцией в нашей стране и западными европейскими и североамериканскими странами. Мы находимся на пике эпидемии с ростом заболеваемости, поздним выявлением ВИЧ и, соответственно, с поздним назначением АРВТ, недостаточным охватом лечения этой категории больных, с большим числом пациентов с коморбидными состояниями, включая туберкулез, наркоманию, вирусный гепатит и др. [1, 3, 4, 5, 7, 11, 16, 19, 23]. Совокупность этих факторов дополняет возможность негативного исхода СВИ или способствует его тяжелому течению. В этой связи при угрозе развития СВИ нельзя исключать вероятность его неблагоприятного прогноза.

Профилактика и лечение

Существуют доказательства эффективности своевременного назначения АРВТ до развития тяжелого иммунодефицитного состояния и после непосредственного лечения оппортунистических заболеваний. Необходимо подвергать пациентов углубленным диагностическим исследованиям с целью выявления латентных и субклинических форм оппортунистических инфекций до начала АРВТ. Также следует своевременно выявлять пациентов с высоким риском развития синдрома, определять оптимальное время назначения и присоединения АРВТ у пациентов с уже имеющимися оппортунистическими инфекциями. В случае коинфекции ТБ и ВИЧ, ВОЗ рекомендует начинать АРВТ вскоре после формирования хорошей переносимости противотуберкулезной терапии, оптимальные сроки составляют не менее 2 недель и не более 8 недель после начала лечения туберкулеза [9, 10, 15, 38].

Важным составляющим ведением пациентов с СВИ является оптимальный подход к лечению ОИ. В случаях легкого течения синдрома

возможно назначение нестероидных противовоспалительных препаратов, при более тяжелом течении рассматривается назначение глюкокортикостероидов. Следует помнить, что при некорректном лечении ОИ, сопутствующая гормональная терапия может ухудшить течение заболевания, привести к его генерализации и летальному исходу [41].

В случаях развития СВИ пациенты должны быть госпитализированы и курироваться подготовленными врачами-инфекционистами.

СВИ не всегда требует прерывания АРВТ. Во многом исход зависит от соблюдения баланса между началом АРВТ, лечением вторичных заболеваний и проведением поддерживающей терапии.

СПИД и СВИ

Сопоставляя природу и проявления этих состояний, можно отметить общую особенность — развитие у больных в продвинутых стадиях оппортунистических инфекций или вторичных заболеваний. Их перечень совпадает по многим клиническим проявлениям, в частности воспалительным инфекционным заболеваниям, имеющим бактериальную, вирусную, грибковую природу, а также ВИЧ-обусловленным онкологическим болезням [42]. Тот и другой синдром характерен для пациентов с длительным анамнезом ВИЧ-инфекции, возможным сопутствующим употреблением психоактивных веществ и для лиц, ведущих асоциальный образ жизни [11]. У таких пациентов в процессе заболевания возможны по меньшей мере 3 сценария развития патологических процессов: успешное проведение АРВТ с пролонгированием жизни на годы, летальный исход без АРВТ через СПИД, и ухудшение состояния с возможным неблагоприятным исходом через СВИ, являющегося эквивалентом АРВТ-индуцированного СПИДа. Различия касаются лабораторных проявлений двух синдромов (рис. 2). В первом случае без АРВТ прослеживается характерная динамика изменений CD4-лимфоцитов и РНК ВИЧ в крови, отражающая развитие иммуносупрессии и активации репродукции ВИЧ. При СВИ в течении первых недель с начала АРВТ происходит излом кривых с активацией иммунитета и подавлением вирусной активности, что клинически проявляется ВИЧ-обусловленными заболеваниями.

Заключение

Парадигма ведения ВИЧ-инфицированных пациентов заключается в раннем начале АРВТ, что в свою очередь приводит к уменьшению рисков развития СВИ. Однако в практике врача

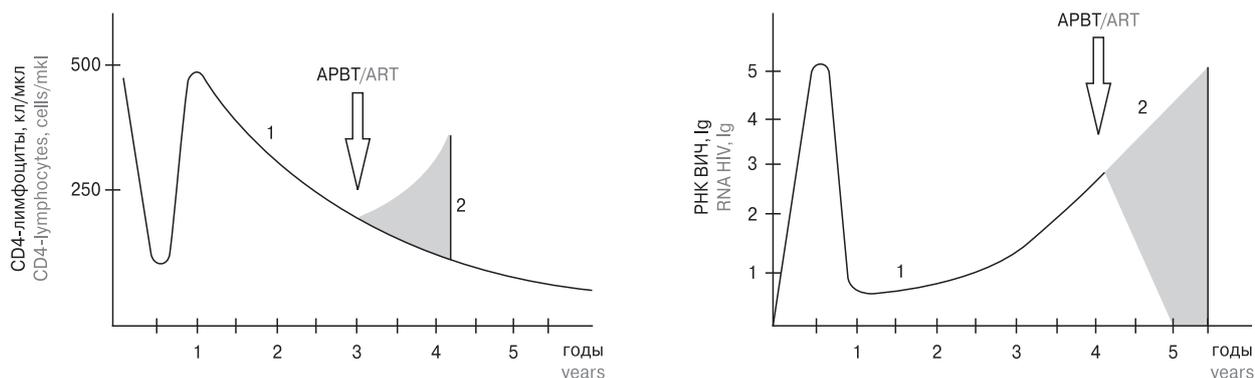


Рисунок 2. Неблагоприятные лабораторные проявления на фоне АРВТ у пациентов в стадии СПИД (1) и при развитии СВИ (2)

Figure 2. Unfavorable laboratory manifestations in patients receiving ART in AIDS stage (1) and during immune reconstitution syndrome development (2)

Примечание: общая динамика CD4-лимфоцитов и РНК ВИЧ в крови при ВИЧ-инфекции показана сплошной линией, характерные для СВИ — обозначена серым цветом.

Note: the general dynamics of CD4-lymphocytes and HIV RNA in blood in HIV infection is shown by a solid line, characteristic of IRIS with gray color.

встречаются пациенты с продвинутой стадией иммуносупрессии и начало АРВТ так или иначе сопряжено с риском формированием СВИ. Усложняет ситуацию скрытое течение оппортунистических инфекций и ограниченные возможности в проведении диагностических мероприятий.

Начало АРВТ и активация иммунитета может сопровождаться появлением или усугублением оппортунистических, сопутствующих инфекций и заболеваний, приводящих к неблагоприятным исходам. К категории СВИ относятся те случаи, когда лабораторно подтверждаются подавление вирусной активности и увеличение CD4-лимфоцитов в крови, а ухудшение клиники ВИЧ-инфекции хронологически связано с назначением, изме-

нением схем или возобновлением АРВТ и происходит в течении первых месяцев лечения. Некоторые авторы обозначают четкие критерии СВИ, которые не во всех случаях можно проследить в виду клинического полиморфизма проявлений [30]. Вместе с тем даже в этих условиях полиморфизма при нехарактерных или противоречивых изменениях РНК ВИЧ и CD4-лимфоцитов в крови с учетом: а) клинических проявлений; б) лабораторных проявлений; в) наличия предрасполагающих факторов; г) исключения имитирующих факторов и причин, можно диагностировать СВИ.

С точки зрения авторов настоящей публикации, этот диагноз необходимо выставлять в истории болезни или амбулаторные карты после указания на проводимую АРВТ.

Список литературы/References

1. Азовцева О.В., Архипов Г.С., Архипова Е.И. Сравнительный анализ причин смертности ВИЧ-инфицированных больных // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 4. С. 86–91. [Azovtseva O.V., Arhipov G.S., Arkhipova E.I. A comparative analysis of causes of death in HIV infected patients. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 86–91. doi: 10.22328/2077-9828-2015-7-4-86-91 (In Russ.)]
2. Белов Б.С., Белова О.Л. ВИЧ-инфекция: ревматологические аспекты // Русский медицинский журнал. 2008. Т. 16, № 24. С. 1615–1618. [Belov B.S., Belova O.L. HIV-infection: rheumatological aspects. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2008, vol. 16, no. 24, pp. 1615–1618. (In Russ.)]
3. Битнева А.М., Козлова Т.П., Савинцева Е.В. Особенности начала и течения синдрома восстановления иммунитета у больных туберкулезом легких // Проблемные науки. 2017. № 6 (19). С. 104–105. [Bitnyova A.M., Kozlova T.P., Savintseva E.V. Features of the onset and course of the immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy nauki = Problem Sciences*, 2017, no. 6 (19), pp. 104–105. (In Russ.)]
4. Бойко А.В. Синдром восстановления иммунного ответа у больных с ко-инфекцией туберкулез/ВИЧ/СПИД // Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. 2014. № 5 (7). С. 5–7. [Bojko A.V. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with co-infection tuberculosis/HIV/AIDS. *Vestnik Soveta molodyh uchjonyh i specialistov Cheljabinskoy oblasti = Bulletin of Council of Young Scientists and Specialists of Chelyabinsk Region*, 2014, no. 5 (7), pp. 5–7. (In Russ.)]
5. ВИЧ 2014/2015. Под ред. Хоффман К., Рокштро Ю.К. Гамбург: Medizin Fokus, 2015. 755 с. [VICH 2014/2015. Pod red. Hoffman K., Rokshtro Ju.K.]. *Hamburg: Medizin Fokus, 2015. 755 p.*

6. Загдын З.М. Профилактическое лечение туберкулеза среди больных ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2014. Т. 6, № 4. С. 17–23. [Zagdyn Z.M. Preventive TB treatment in HIV patients. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 17–23. doi: 10.22328/2077-9828-2014-6-4-17-23 (In Russ.)]
7. Захарова Н.Г., Дворак С.И., Плавинский С.Л. Причины неблагоприятных исходов у больных с ВИЧ-инфекцией, принимавших ВААРТ. Часть 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 3. С. 48–54. [Zakharova N.G., Dvorak S.I., Plavinski S.L. The causes of unfavorable out-comes among patients taking HAART. Part 1. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 48–54. (In Russ.)]
8. Зими́на В.Н., Васильева И.А., Батыров Ф.А. Острое развитие туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов как проявления синдрома восстановления иммунитета у больных с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. 2010. Т. 87, № 4. С. 58–60. [Zimina V.N., Vasilieva I.A., Batyrov F.A. Acute development of tuberculosis of intrathoracic lymph nodes as manifestations of immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with HIV infection. *Tuberkulez i bolezni legkih = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2010, vol. 87, no. 4, pp. 58–60. (In Russ.)]
9. Зими́на В.Н., Кравченко А.В., Зюзя Ю.Р., Васильева И.А. Диагностика и лечение туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 240 с. [Zimina V.N., Kravchenko A.V., Zyuzya Yu.R., Vasil'eva I.A. Diagnostika i lechenie tuberkuleza v sochetanii s VICH-infektsiei [Diagnostics and treatment of tuberculosis in combination with HIV infection]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 240 p.]
10. Корж Е.В. Современные взгляды на антиретровирусную терапию у больных с ко-инфекцией туберкулез/ВИЧ // Туберкулез, легочные болезни, ВИЧ-инфекция. 2012. № 1 (8). С. 115–121. [Korz E.V. Modern opinions at antiretroviral therapy in patients with the tuberculosis/HIV co-infection. *Tuberkulez, legochnye bolezni, VICH-infekcija = Tuberculosis, pulmonary diseases, HIV infection*, 2012, no. 1 (8), pp. 115–121. (In Russ.)]
11. Леонова О.Н., Степанова Е.В., Беляков Н.А. Тяжелые и коморбидные состояния у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1, С. 55–62. [Leonova O.N., Stepanova Y.V., Belyakov N.A. Severe and comorbid conditions in HIV patients: an analysis of adverse outcomes. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 55–62. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-55-64 (In Russ.)]
12. Маркелов Ю.М., Пахомова Е.В., Рожкова И.И. Особенности распространения и летальность больных с сочетанной инфекцией ВИЧ+ТБ в Карелии // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. Т. 8, № 3. С. 65–73. [Markelov Yu.M., Pakhomova E.V., Rozhkova I.I. Distribution and mortality patterns in patients co-infected with HIV and TB in Karelia. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 65–73. doi: 10.22328/2077-9828-2016-8-3-65-73 (In Russ.)]
13. Матиевская Н.В. Воспалительный синдром восстановления иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов: факторы риска, клинические проявления, исходы, профилактика // Вестник Балтийского Федерального Университета им. И. Канта. Серия: естественные и медицинские науки. 2012. № 7. С. 44–51. [Matiyevskaya N.V. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV-infected patients: risk factors, clinical features, outcomes, prevention. *Vestnik Baltijskogo Federal'nogo Universiteta im. I. Kanta. Serija: estestvennye i medicinskie nauki = Bulletin of the Baltic Federal University I. Kant. Series: Natural and Medical Sciences*, 2012, no. 7, pp. 44–51. (In Russ.)]
14. Мусатов В.Б., Яковлев А.А., Савченко М.А., Соколова О.И. Летальные исходы у ВИЧ-инфицированных больных, имеющих неопределяемую вирусную нагрузку на фоне антиретровирусной терапии // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2017. № 4 (21). С. 67–71. [Musatov V.B., Yakovlev A.A., Savchenko M.A., Sokolova O.I. Lethal outcomes in HIV positive patients with undetectable viral load on antiretroviral therapy. *Infekcionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious diseases: news, opinions, training*, 2017, no. 4 (21), pp. 67–71. (In Russ.)]
15. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 608 с. [Pokrovskiy V.V. VICH-infektsiya i SPID: nacional'noe rukovodstvo [HIV infection and AIDS: national guidance]. Moscow: GEOTAR-Media, 2013. 608 p.]
16. Рахманова А.Г., Яковлев А.А., Дмитриева М.И., Виноградова Т.Н., Козлов А.А. Анализ причин смерти ВИЧ-инфицированных в 2008–2010 гг. По материалам клинической инфекционной больницы им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург // Казанский медицинский журнал. 2012. Т. 93, № 3. С. 522–526. [Rakhmanova A.G., Yakovlev A.A., Dmitrieva M.I., Vinogradova T.N., Kozlov A.A. Analysis of the causes of death in HIV-infected individuals in 2008–2010 according to the data of the Clinical Infectious Disease Hospital named after S.P. Botkin, St. Petersburg. *Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2012, vol. 93, no. 3, pp. 522–526. (In Russ.)]
17. Симбирцев А.С. Иммунопатогенез и перспективы иммуномодулирующей терапии ВИЧ-инфекции. Часть 1. Общие вопросы иммунологии и ВИЧ // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2017. Т. 9, № 1. С. 22–35. [Simbirtsev A.S. Immunopathogenesis of and prospects for immunomodulatory therapy for HIV infection. Part 1. The general aspects of immunology and HIV. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 22–35. doi: 10.22328/2077-9828-2017-9-1-22-35 (In Russ.)]
18. Степанова Е.В. Герпесвирусные заболевания и ВИЧ-инфекция. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2009. 60 с. [Stepanova E.V. Gerpessvirusnye zabolevaniya i VICH-infektsiya [Herpesvirus and HIV infection]. St. Petersburg: Baltic Medical Education Center, 2009. 60 p.]
19. Степанова Е.В., Леонова О.Н., Пантелева О.В. Причины тяжелого течения и смертей у больных с ВИЧ и коинфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2014. Т. 6, № 4. С. 115–117. [Stepanova E.V., Leonova O.N., Panteleeva O.V. Causes of severe course and death in patients with HIV and co-infection. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 115–117. (In Russ.)]
20. Тищенко Т.В., Цыркунов В.М. Воспалительный синдром восстановления иммунитета у ВИЧ-инфицированных пациентов: клинико-морфологические аспекты // Здравоохранение (Минск). 2017. № 10. С. 5–11. [Tishchenko G.V., Tsyrkunov V.M. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients: clinical and morphological aspects. *Zdravoohranenie (Minsk) = Health (Minsk)*, 2017, no. 10, pp. 5–11. (In Russ.)]

21. Улюкин И.М. ВИЧ-инфекция: особенности восстановления иммунной системы на фоне специфической терапии туберкулеза // Клиническая патофизиология. 2017. Т. 23, № 2. С. 29–33. [Uliukin I.M. HIV-infection: features of immune reconstitution on the background of specific therapy of tuberculosis. *Klinicheskaja patofiziologija = Clinical Pathophysiology*, 2017, vol. 23, no. 2, pp. 29–33. (In Russ.)]
22. Черенько С.А., Матвеева С.Л. Причины нарушения тиреоидного гомеостаза при ко-инфекции туберкулез/ВИЧ // Туберкулез, легочные болезни, ВИЧ-инфекция. 2014. № 1 (16). С. 8–12. [Chereniko S.A., Matveeva S.L. Causes of thyroid dysfunction of homeostasis in co-infection with tuberculosis/HIV. *Tuberkulez, legochnye bolezni, VICH-infekcija = Tuberculosis, Lung Diseases, HIV Infection*, 2014, no. 1 (16), pp. 8–12. (In Russ.)]
23. Шеломов А.С., Степанова Е.В., Леонова О.Н., Смирнова Н.Л. Оппортунистические заболевания как причины поражения центральной нервной системы у больных ВИЧ-инфекцией // Журнал инфектологии. 2016. Т. 8, № 3. С. 107–115. [Shelomov A.S., Stepanova E.V., Leonova O.N., Smirnova N.L. Opportunistic diseases as the cause of damage to the central nervous system in patients with HIV-infection. *Zhurnal infektologii = Infectology Journal*, 2016, vol. 8, no. 3, pp. 107–115. (In Russ.)]
24. Шмидт Т.Е. Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия и другие неврологические проявления реактивации вируса JC // Неврологический журнал. 2014. Т. 19, № 4. С. 4–10. [Shmidt T.E. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other neurological symptoms of JC virus reactivation. *Nevrologicheskij zhurnal = Neurological Journal*, 2014, vol. 19, no. 4, pp. 4–10. (In Russ.)]
25. Яковлев А.А., Мусатов В.Б., Савченко М.А. Причины летальных исходов у ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих антиретровирусную терапию // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2015. Т. 7, № 1. С. 84–88. [Yakovlev A.A., Musatov V.B., Savchenko M.A. Causes of death among HIV infected patients receiving antiretroviral therapy. *VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 84–88. doi: 10.22328/2077-9828-2015-7-1-84-89 (In Russ.)]
26. Bicanic T., Meintjes G., Rebe K., Williams A., Loyse A., Wood R., Hayes M., Jaffar S., Harrison T. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-associated cryptococcal meningitis: a prospective study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2009, vol. 51, no. 2, pp. 130–134. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181a56f2e
27. Boulware D.R., Meya D.B., Bergemann T.L., Wiesner D.L., Rhein J., Musubire A., Lee S.J., Kambugu A., Janoff E.N., Bohjanen P.R. Clinical features and serum biomarkers in HIV immune reconstitution inflammatory syndrome after cryptococcal meningitis: a prospective cohort study. *PLoS Med.*, 2010, vol. 7, no. 12: e1000384. doi: 10.1371/journal.pmed.1000384
28. Crum N.F., Ganesan A., Johns S.T., Wallace M.R. Graves disease: an increasingly recognized immune reconstitution syndrome. *AIDS*, 2006, vol. 20, no. 3, pp. 466–469. doi: 10.1097/01.aids.0000196173.42680.5f
29. Dunić I., Djurković-Djaković O., Vesić S., Zerjav S., Jevtović D. Herpes zoster as an immune restoration disease in AIDS patients during therapy including protease inhibitors. *Int. J. STD AIDS*, 2005, vol. 16, no. 7, pp. 475–478. doi: 10.1258/0956462054308404
30. French M.A. Immune reconstitution inflammatory syndrome: a reappraisal. *Clin. Infect. Dis.*, 2009, vol. 48, iss. 1, pp. 101–107. doi: 10.1086/595006
31. French M.A., Price P., Stone S.F. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS*, 2004, vol. 18, no. 12, pp. 1615–1627.
32. George V., Harrison L., Roach M., Li X.D., Tierney C., Fischl M.A., Aberg J., Tebas P., Asmuth D.M., Pollard R.B., Godfrey C., Pahwa S. Associations of plasma cytokine and microbial translocation biomarkers with immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Infect. Dis.*, 2017, vol. 216, no. 9, pp. 1159–1163. doi: 10.1093/infdis/jix460
33. Gopal R., Rapaka R.R., Kolls J.K. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with pulmonary pathogens. *Eur. Respir. Rev.*, 2017, vol. 26, no. 143: e160042. doi: 10.1183/16000617.0042-2016
34. Haddow L.J., Moosa M.Y., Easterbrook P.J. Validation of a published case definition for tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS*, 2010, vol. 24, iss. 1, pp. 103–108. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832ec1f4
35. Jaffe H.W., De Stavola B.L., Carpenter L.M., Porter K., Cox D.R. Immune reconstitution and risk of Kaposi sarcoma and non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected adults. *AIDS*, 2011, vol. 25, iss. 11, pp. 1395–1403. doi: 10.1097/QAD.0b013e3283489c8b
36. Jagannathan P., Davis E., Jacobson M., Huang L. Life-threatening immune reconstitution inflammatory syndrome after Pneumocystis pneumonia: a cautionary case series. *AIDS*, 2009, vol. 23, iss. 13, pp. 1794–1796. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832d9b20
37. Jevtović D.J., Salemović D., Ranin J., Pesić I., Zerjav S., Djurković-Djaković O. The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.*, 2005, vol. 6, iss. 2, pp. 140–143. doi: 10.1111/j.1468-1293.2005.00277.x
38. Letang E., Almeida J.M., Miro J.M., Ayala E., White I.E., Carrilho C., Bastos R., Nhampossa T., Mendez C., Campbell T.B., Alonso P.L., Nanche D. Predictors of immune reconstitution inflammatory syndrome-associated with Kaposi sarcoma in Mozambique: a prospective study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2010, vol. 53, pp. 589–597. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181bc476f
39. McCombe J.A., Auer R.N., Maingat F.G., Houston S., Gill M.J., Power C. Neurologic immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/AIDS: outcome and epidemiology. *Neurology*, 2009, vol. 72, no. 9, pp. 835–841. doi: 10.1212/01.wnl.0000343854.80344.69
40. Morbidity and Mortality Weekly Report. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. Eds. Kaplan J.E., Benson C., Holmes K.H., Brooks J.T., Pau A., Masur H. 2009, 58 (RR04), pp. 1–198. URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5804a1.htm> (15.05.2018)
41. Murdoch D.M., Venter W.D.F., Rie A.V., Feldman C. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res. Ther.*, 2007, vol. 4, no. 9, 10 p. doi: 10.1186/1742-6405-4-9
42. Phillips P., Bonner S., Gataric N., Bai T., Wil-Cox P., Hogg R, O'Shaughnessy M., Montaner J. Nontuberculous mycobacterial immune reconstitution syndrome in HIV-infected patients: spectrum of disease and long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.*, 2005, vol. 41, iss. 10, pp. 1483–1497. doi: 10.1086/497269
43. Sharma S.K., Dhooria S., Barwad P., Kad-Hiravan T., Ranjan S., Miglani S., Gupta D. A study of TB-associated immune reconstitution inflammatory syndrome using the consensus case-definition. *Indian J. Med. Res.*, 2010, vol. 131, pp. 804–808.

44. Sharma S.K., Soneja M. HIV & immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS). *Indian J. Med. Res.*, 2011, vol. 134, no. 6, pp. 866–877. doi: 10.4103/0971-5916.92632
45. Shelburne S.A., Montes M., Hamill R.J. Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2006, vol. 57, iss. 2, pp. 167–170. doi: 10.1093/jac/dki444
46. Vendrely A., Bienvenu B., Gasnault J., Thiebault J.B., Salmon D., Gray F. Fulminant inflammatory leukoencephalopathy associated with HAART-induced immune restoration in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.*, 2005, vol. 109, iss. 4, pp. 449–455. doi: 10.1007/s00401-005-0983-y
47. Walker N.F., Scriven J., Meintjes G., Wilkinson R.J. Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-infected patients. *HIV AIDS (Auckl.)*, 2015, vol. 7, pp. 49–64. doi: 10.2147/HIV.S42328
48. Wiesner D.L., Boulware D.R. Cryptococcus-related immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): pathogenesis and its clinical implications. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2011, vol. 5, no. 4, pp. 252–261. doi: 10.1007/s12281-011-0064-8

Авторы:

Боева Е.В., клинический ординатор кафедры социально значимых инфекций ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; врач-инфекционист, зав. отделением хронической вирусной инфекции Северо-Западного Округного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Беляков Н.А., д.м.н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой социально значимых инфекций ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; главный научный сотрудник ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; руководитель Северо-Западного Округного центра по профилактике и борьбе со СПИД ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Boeva E.V., Resident of the Department of Socially Significant Infections, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Infectious Disease Doctor, Head of Department of Chronic Viral Infection in North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Belyakov N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Full Member, Head of the Department of Socially Significant Infections, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation; Chief Researcher of the Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Head of North-West District Center for Prevention and Control of AIDS, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.01.2018
Отправлена на доработку 25.04.2018
Принята к печати 30.04.2018

Received 11.01.2018
Revision received 25.04.2018
Accepted 30.04.2018

ИЗМЕНЕНИЯ МОНОЦИТАРНОГО ХЕМОАТТРАКТАНТНОГО ПРОТЕИНА-1 ПРИ *HELICOBACTER PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫХ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Л.В. Матвеева, Р.Х. Капкаева, А.Н. Чудайкин, Л.С. Мишанина

ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева,
г. Саранск, Россия

Резюме. Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1) — низкомолекулярный цитокин, секретируемый многими клетками организма. Синтез MCP-1 могут индуцировать липополисахариды бактерий, ряд цитокинов. Считается, что MCP-1 регулирует миграцию и инфильтрацию тканей моноцитами, Т-лимфоцитами памяти, натуральными киллерными клетками, участвует в дифференцировке «наивных» Т-хелперов. Имеются данные об онкогенной и противоопухолевой активности MCP-1 на разных этапах опухолевой прогрессии. Целью работы явилось определение и сопоставление сывороточного уровня MCP-1 с инфицированностью *Helicobacter (H.) pylori* при предраковых состояниях и раке желудка. *Материал и методы.* Обследованы при получении информированного согласия 204 больных с предопухолевыми заболеваниями желудка, 40 больных раком желудка и 40 здоровых добровольцев. У обследованных при эзофагогастроуденоскопии проводили забор материала при прицельной биопсии для гистологического и микробиологического исследований. Кровь на иммунологическое обследование забиралась в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 5 мл в пробирку без консервантов, сыворотка выделялась центрифугированием в течение 10 мин. Иммуноферментным методом в сыворотке крови обследуемых определяли уровень MCP-1, титр суммарных антител к цитотоксин-ассоциированному протеину *H. pylori*. Полученные данные статистически обработали. *Результаты.* Количество MCP-1 в сыворотке крови обследованных больных значительно превышало данные здоровых лиц во всех группах сравнения. Значения MCP-1 при обострении язвенной болезни желудка были выше показателя больных с обострением хронического неатрофического и очагово-атрофического гастрита. Концентрация MCP-1 > 280 пг/мл определилась у 17,6% больных с предраковыми состояниями желудка. При ulcerозном процессе отмечалась сильная прямая взаимосвязь тяжести его течения и количества MCP-1 в сыворотке крови. Сывороточный уровень MCP-1 у 5,0% больных раком желудка находился на верхней границе нормальных значений, а у 77,5% больных превышал ее. Показатель при раке желудка значительно превалировал над значениями при предраковых состояниях, был взаимосвязан со стадией опухолевого процесса. Уровень MCP-1 в сыворотке крови обследованных здоровых добровольцев, больных с обострением хронического гастрита, язвенной болезни желудка, полипозом, раком желудка был взаимосвязан с титрами суммарных антител к цитотоксин-ассоциированному протеину *H. pylori*. *Заключение.* Определение сывороточного уровня MCP-1 при предраковых состояниях и раке желудка является диагностически ценным.

Адрес для переписки:

Матвеева Любовь Васильевна
430032, Россия, г. Саранск, ул. Ульянова, 26а, Медицинский
институт ФГБОУ ВО МГУ им. Н.П. Огарева.
Тел.: 8 (8342) 35-25-16 (служебн.).
Факс: 8 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Contacts:

Lyubov V. Matveeva
430032, Russian Federation, Saransk, Ulyanov str., 26a, Medical
Institute National Research Mordovia State University.
Phone: +7 (8342) 35-25-16 (office).
Fax: +7 (8342) 32-19-83.
E-mail: MatveevaLjubov1@mail.ru

Библиографическое описание:

Матвеева Л.В., Капкаева Р.Х., Чудайкин А.Н., Мишанина Л.С. Изменения моноцитарного хемоаттрактантного протеина-1 при *Helicobacter pylori*-ассоциированных гастроуденальных заболеваниях // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 150–156. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-150-156

Citation:

Matveeva L.V., Kapkaeva R.Ch., Chudajkin A.N., Mishanina L.S. Changes monocyte chemoattractants protein-1 in *Helicobacter pylori*-associated gastroudodenal diseases // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 150–156. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-150-156

Сопоставление значений показателя с титрами суммарных антител к цитотоксин-ассоциированному протеину *H. pylori* прогностически значимо, так как позволяет оценить выраженность индукционного сигнала к цитокинопродукции.

Ключевые слова: моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1, *Helicobacter pylori*, атрофический гастрит, язвенная болезнь желудка, рак желудка.

CHANGES MONOCYTE CHEMOATTRACTANTS PROTEIN-1 IN *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED GASTRODUODENAL DISEASES

Matveeva L.V., Kapkaeva R.C., Chudajkin A.N., Mishanina L.S.

National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation

Abstract. Chemoattractants monocyte protein-1 (MCP-1) is a low molecular weight cytokine, secreted by many cells of the body. The synthesis of MCP-1 can induce the lipopolysaccharides of bacteria, a range of cytokines. It is believed that MCP-1 regulates the migration and infiltration of tissue by monocytes, T-lymphocytes memory, natural killer cells, is involved in differentiation of naive T-helper cells. There is evidence oncogenic and antitumor activity of MCP-1 at different stages of tumor progression. The aim of this work was the determination and comparison of serum level of MCP-1 by infection with *Helicobacter (H.) pylori* in precancerous conditions and gastric cancer. **Material and methods.** Surveyed with the informed consent 204 patients with precancerous diseases of the stomach, 40 patients with gastric cancer and 40 healthy volunteers. Patients at esophagogastroduodenoscopy conducted the fence of material for target biopsy for histological and microbiological studies. Blood on the immunoassay climbed in the morning on an empty stomach from the cubital vein in a volume of 5 ml in a vial without preserving agent, the serum was separated by centrifugation for 10 minutes. By ELISA in the serum of patients determined the level of MCP-1, titer of total antibodies to the cytotoxin-associated protein of *H. pylori*. The obtained data statistically processed. **Results.** The amount of MCP-1 in serum of the patients significantly exceeded the data of healthy individuals in all groups of comparison. Values of MCP-1 during exacerbation of gastric ulcer was higher than patients with exacerbation of chronic not atrophic and focal atrophic gastritis. The concentration of MCP-1 > 280 pg/ml was detected in 17.6% of patients with pre-cancerous conditions of the stomach. When ulceration process there was a strong direct correlation of the severity of its course and the number of MCP-1 in serum. Serum level of MCP-1 in 5.0% of patients with gastric cancer was at the upper limit of normal values, and 77.5% of patients exceeded it. Indicator in gastric cancer significantly prevailed over the values in precancerous conditions, was correlated with the tumor stage. The level of MCP-1 in serum of the examined healthy volunteers, patients with exacerbation of chronic gastritis, gastric ulcer disease, polyposis, gastric cancer was correlated with the titers of total antibodies to the cytotoxin-associated protein of *H. pylori*. **Conclusion.** Determination of serum level of MCP-1 in precancerous conditions and gastric cancer is diagnostically valuable. Comparison of indicator values with the titers of total antibodies to the cytotoxin-associated protein of *H. pylori* prognostically significant, as it allows to assess the intensity of the induction signal to production of a cytokine.

Key words: monocyte chemoattractants protein-1, *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis, gastric ulcer disease, gastric cancer.

Введение

Моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (monocyte chemoattractants protein-1, MCP-1/CCL2) — цитокин с молекулярной массой 13 kDa, образован 76 аминокислотами, относится к подсемейству СС хемокинов. Продуцентами MCP-1 являются многие клетки организма: моноциты/макрофаги (основные), эндотелиоциты, мастоциты, Т-лимфоциты, эпителиальные, гладкомышечные, мезангиальные клетки, фибробласты, астроциты. Рецепторы MCP (CCR2) экспрессированы на поверхности лейкоцитов, эпителиальных, эндотелиальных клеток [2, 9].

Синтез MCP-1 могут индуцировать липополисахариды бактерий, интерлейкин (IL)-1 β , IL-4, IL-6, туморнекротизирующий фактор α (TNF α), интерферон (IFN) γ [1, 6, 8]. Установ-

лено [12, 15, 17], что *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) стимулирует секрецию MCP-1 эпителиальными клетками желудка.

Считается [8, 9, 10], что MCP-1 регулирует миграцию и инфильтрацию тканей моноцитами, Т-лимфоцитами памяти, натуральными киллерными клетками; действует как мощный фактор поляризации «наивных» Т-хелперов (Th) в направлении Th2-фенотипа, активируя IL-4.

Имеются данные [11] о двойной роли активации сигнального пути CCL2/CCR2 при опухолевом процессе: в начале опухолевого роста — иммунобиологический надзор, в дальнейшем — поддержание роста и метастазирования опухоли. MCP-1 может усиливать цитотоксическую активность макрофагов, индуцировать экспрессию Fas-лиганда на опухолевых клетках, способствуя их апоптозу и оказывая противоопухолевое действие. Повышение

инфильтрации опухолевой ткани макрофагами и стимуляция ангиогенеза свидетельствуют о проонкогенном эффекте МСР-1 [9]. Установлено [14], что прерывание взаимодействия CCL2/CCR2 угнетает прогрессирование и метастазирование опухоли.

Целью работы явилось определение и сопоставление сывороточного уровня МСР-1 с инфицированностью *H. pylori* при предраковых состояниях и раке желудка.

Материалы и методы

Обследованы при получении информированного согласия 244 больных с заболеваниями желудка и 40 здоровых добровольцев, не имеющих на момент обследования анамнестических, клинических, лабораторных и инструментальных признаков обострения гастропатологии, вошедших в контрольную группу.

Исследования соответствуют этическим и правовым нормам, законодательным требованиям документов, регламентирующих проведение биомедицинских исследований с участием человека, действующего законодательства Российской Федерации и Республики Мордовия, одобрены Локальным этическим комитетом МГУ им. Н.П. Огарева.

Обследование проводилось на клинических базах Мордовской республиканской клинической больницы, Краснослободской центральной районной больницы, Мордовского республиканского онкологического диспансера, микробиологической лаборатории Республиканской клинической больницы № 4 г. Саранска.

Больные с обострением хронического гастрита были разделены на группы в зависимости от морфологически определенной стадии атрофии. В 1 группу вошли пациенты с хроническим неатрофическим гастритом ($n = 42$), во 2 группу — с очагово-атрофическим гастритом ($n = 40$), в 3 группу — с распространенным атрофическим гастритом ($n = 40$). Пациенты с обострением язвенной болезни желудка (ЯБЖ) были объединены в 4 группу ($n = 42$), больные полипозом желудка ($n = 40$) — в 5 группу. Легкое течение заболевания было определено у 12 (28,6%) обследованных лиц 4 группы, течение средней тяжести — у 20 (47,6%), тяжелое течение — у 10 (23,8%).

Шестую группу составили 40 больных раком желудка. II стадия опухолевого процесса была диагностирована у 11 (27,5%) пациентов, III — у 15 (37,5%), IV — у 14 (35%). При гистологическом исследовании в 82,5% случаев обнаруживалась аденокарцинома разной степени дифференцировки, в 17,5% — перстневидноклеточный рак. Статистически значимые возрастные различия между группами отсутствовали.

Диагноз устанавливался на основании данных анамнеза, клинических проявлений и подтверждался с помощью физикальных, биохимических, эндоскопических, ультразвуковых, морфологических методов исследования.

Критерии исключения из контрольной группы и групп сравнения — отказ от участия в исследовании; наличие острых инфекционных заболеваний; наличие сопутствующих хронических заболеваний в стадии обострения; состояния, препятствующие проведению рН-метрии, эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС); наличие предопухолевого и/или опухолевого заболевания внежелудочной локализации; прием антибактериальных и/или антисекреторных препаратов в течение последних 6 месяцев.

У обследованных лиц при ЭГДС проводили забор материала при прицельной биопсии. Материал в течение 1–1,5 ч после взятия доставляли для дальнейшего исследования в патогистологическую и микробиологическую лаборатории (приготовление мазка-отпечатка и окраска по Романовскому–Гимзе).

Кровь на иммунологическое обследование забиралась в утренние часы натощак из локтевой вены в объеме 5 мл в пробирку без консервантов. Время коагуляции в пробирке не превышало 30 мин при комнатной температуре (20–25°C). Сыворотка выделялась центрифугированием в течение 10 мин и помещалась в отдельные стерильные пробирки, образцы хранились при температуре не выше –20°C до процедуры иммуноферментного анализа (не более 6 недель).

Экспресс-диагностика хеликобактериоза дыхательным методом проводилась с применением тест-системы ХЕЛИК® с индикаторной трубкой (ООО «АМА», Россия).

Уреазную активность *H. pylori* в гастробиоптатах оценивали при помощи тест-системы ХЕЛПИЛ® (Бланк) (ООО «АМА», Россия).

Твердофазным иммуноферментным методом в сыворотке крови обследуемых определяли уровень МСР-1, титр суммарных антител (IgG+IgM+IgA) к цитотоксин-ассоциированному протеину (САТ к CagA) *H. pylori* с применением наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Россия), следуя приложенным инструкциям. Производителем диагностических тест-систем рекомендовано считать нормальным уровень МСР-1, находящийся в диапазоне 50–280 пг/мл. При оценке уровня САТ к CagA *H. pylori* учитывали отрицательный, сомнительный (титр < 1:5), слабоположительный (1:5), положительный (1:10–1:20) и сильноположительный (1:40–1:80) результат.

Для статистической обработки результатов исследования использовали методы непараметрического анализа программы Microsoft Excel 7.0.

Полученные данные отражали в виде медианы с указанием первого и третьего квартилей (Ме [Q1; Q3]). Сравнение показателей проводили с помощью критерия Манна–Уитни, значимыми различия между группами считали при $p \leq 0,05$.

Для оценки взаимосвязи величин определяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). В зависимости от знака (+) или (-) корреляция оценивалась как прямая или обратная соответственно. Сила взаимосвязи определялась по величине коэффициента r_s : при $r_s < 0,19$ — очень слабая, $r_s = 0,2-0,29$ — слабая; $r_s = 0,3-0,49$ — умеренная; $r_s = 0,5-0,69$ — средняя, $r_s = 0,7-1$ — сильная.

Результаты

Количество MCP-1 в сыворотке крови обследованных больных превышало ($p < 0,01-0,001$) данные здоровых лиц (91 [78; 104] пг/мл) во всех группах сравнения (табл. 1). Значения MCP-1 при обострении язвенной болезни желудка были выше ($p < 0,05$) показателя больных с обострением хронического неатрофического и очагово-атрофического гастрита.

Концентрация MCP-1 > 280 пг/мл определялась у 36 (17,6%) больных с предраковыми состояниями желудка: у 6 (14,3%) пациентов 1-й, 6 (15,0%) 2-й, 5 (12,5%) 3-й, 13 (31,0%) 4-й и 6 (15,0%) 5-й групп соответственно. Кроме того при ulcerозном процессе отмечалась сильная прямая взаимосвязь тяжести его течения и количества MCP-1 (табл. 2) в сыворотке крови — $r_s = +0,792$, $p < 0,01$.

Сывороточный уровень MCP-1 у 2 (5,0%) больных раком желудка находился на верхней границе нормальных значений (278 пг/мл), а у 31 (77,5%) больного превышал ее. Следует отметить, что данный показатель при раке желудка значимо преваляровал над значениями при предраковых состояниях: на 86,6; 91; 66,7; 47,7; 66,9% относительно 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й групп ($p < 0,001$). Уровень MCP-1 в сыворотке крови обследованных больных раком желудка был взаимосвязан со стадией опухолевого процесса (табл. 3; $r_s = +0,871$, $p < 0,01$), превышал значения контрольной группы: до операции на 282,1%

($p < 0,001$), после операции — на 172,1% ($p < 0,01$). У 4 (28,6%) больных с IV стадией опухолевого процесса после оперативного лечения сохранился повышенный сывороточный уровень MCP-1. Наибольшие до- и послеоперационные значения показателя определялись при низкодифференцированной аденокарциноме, наименьшие — при высокодифференцированной аденокарциноме.

Данные, полученные при проведении хелик-теста, хелпил-теста и микроскопического исследования мазков-отпечатков гастробиоптатов были равнозначны. При микроскопии мазков-отпечатков гастробиоптатов в контрольной группе хеликобактерии определялись у 16 (40,0%) здоровых добровольцев. Выявляемость *H. pylori* при микроскопическом исследовании гастробиоптатов у обследованных больных отражена в таблице 4.

В контрольной группе САТ к CagA *H. pylori* определились у 11 человек (в 27,5% случаев): в титре менее 1:5 — у 3 (7,5%), 1:5 — у 8 (20,0%) обследованных. Выявляемость и титры САТ к CagA *H. pylori* в сыворотке крови обследованных больных представлены в таблице 5.

Уровень MCP-1 в сыворотке крови обследованных здоровых добровольцев, больных с обострением хронического гастрита, ЯБЖ, полипозом, раком желудка был взаимосвязан с титрами САТ к CagA *H. pylori* (табл. 6).

Обсуждение

Превалирование сывороточного уровня MCP-1 у обследованных больных на фоне активного воспалительного процесса в желудке над значениями здоровых лиц подтверждает его функциональную активность как провоспалительного цитокина [1, 5, 6, 8, 9].

Преобладание MCP-1 при обострении язвенной болезни желудка над показателем больных с обострением хронического неатрофического и очагово-атрофического гастрита, а также наличие сильной положительной корреляционной связи тяжести ulcerозного процесса и количества MCP-1 могут быть обусловлены большей воспалительной инфильтрацией слизистой

Таблица 1. Сывороточный уровень MCP-1, пг/мл

Table 1. Serum level MCP-1, pg/ml

MCP-1	1 группа 1 group	2 группа 2 group	3 группа 3 group	4 группа 4 group	5 группа 5 group	6 группа 6 group
Ме [Q1; Q3]	157 [134; 212] */*	175,5 [111; 235] */*	190 [140; 244] */*	237,5 [160; 292] */*, *1,2	197,5 [134; 278] */*	330,5 [292; 386] */*, *1-5

Примечания. *к — статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой; *1, 2, 3, 4, 5 — статистически значимые различия при сравнении с 1, 2, 3, 4, 5 группой.

Notes. *c — statistically significant differences compared with control group; *1, 2, 3, 4, 5 — statistically significant differences compared with 1, 2, 3, 4, 5 group.

Таблица 2. Сывороточный уровень MCP-1 у больных язвенной болезнью желудка в зависимости от течения заболевания, пг/мл

Table 2. Serum level of MCP-1 in patients with gastric ulcer disease in dependence on current disease, pg/ml

MCP-1	4 группа/4 group		
	Легкое течение Easy current	Течение средней тяжести Current average severe	Тяжелое течение Severe current
Me [Q1; Q3]	133,5 [105; 182] * _к / _с	243 [202; 292] * _к / _с	305,5 [278; 382] * _к / _с
Отклонение от нормы, % Deviation from norm, %	–	25,0	80,0

Примечание. *к — статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой.

Note. *с — statistically significant differences compared with control group.

Таблица 3. Сывороточный уровень MCP-1 у больных раком желудка, пг/мл

Table 3. Serum level of MCP-1 in patients with gastric cancer, pg/ml

MCP-1	6 группа/6 group		
	II стадия Stage II	III стадия Stage III	IV стадия Stage IV
Me [Q1; Q3]	267 [255; 296] * _к / _с	330 [307; 363] * _к / _с	395 [374–446] * _к / _с
Отклонение от нормы, % Deviation from norm, %	36,4	86,7	100

Примечание. *к — статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой.

Note. *с — statistically significant differences compared with control group.

Таблица 4. Выявляемость *Helicobacter pylori* при микроскопическом исследовании гастробиоптатов (абс., %)Table 4. Detection of *Helicobacter pylori* by microscopic examination of gastric biopsy specimen (abs., %)

Микроорганизм Microorganisms	1 группа 1 group	2 группа 2 group	3 группа 3 group	4 группа 4 group	5 группа 5 group	6 группа 6 group
Hp+	29 (69,0%)	25 (62,5%)	23 (57,5%)	29 (69,0%)	26 (65,0%)	24 (60,0%)
Hp–	13 (31,0%)	15 (37,5%)	17 (42,5%)	13 (31,0%)	14 (35,0%)	16 (40,0%)

Примечания. Hp+ — определяются *H. pylori*; Hp– — не определяются *H. pylori*.Notes. Hp+ — are determined with *H. pylori*; Hp– — not defined *H. pylori*.**Таблица 5. Выявляемость и титры САТ к CagA *Helicobacter pylori* в сыворотке крови при заболеваниях желудка (абс., %)**Table 5. Detection and titres of SAb to CagA of *Helicobacter pylori* in the blood serum in diseases of the stomach (abs., %)

Титр САТ к CagA <i>H. pylori</i> Titre SAb at CagA <i>H. pylori</i>	1 группа 1 group	2 группа 2 group	3 группа 3 group	4 группа 4 group	5 группа 5 group	6 группа 6 group
–	10 (23,8%)	10 (25,0%)	12 (30,0%)	8 (19,0%)	9 (22,5%)	13 (32,5)
< 1:5	3 (7,14%)	–	–	–	4 (10,0%)	4 (10,0%)
1:5	8 (19,0%)	6 (15,0%)	8 (20,0%)	7 (16,7%)	9 (22,5%)	6 (15,0%)
1:10–1:20	15 (35,7%)	18 (45,0%)	16 (40,0%)	14 (33,3%)	15 (37,5%)	15 (37,5%)
1:40	6 (14,3%)	6 (15,0%)	4 (10,0%)	13 (30,9%)	3 (7,5%)	2 (5,0%)

Таблица 6. Взаимосвязь сывороточных уровня MCP-1 и титров САТ к CagA *Helicobacter pylori*Table 6. Interrelation serum levels of MCP-1 and titres of SAb to CagA of *Helicobacter pylori*

r_s	Контрольная группа Control group	1 группа 1 group	2 группа 2 group	3 группа 3 group	4 группа 4 group	5 группа 5 group	6 группа 6 group
		+0,794*	+0,774*	+0,837*	+0,845*	+0,844*	+0,819*

Примечание. * — статистически значимая корреляция.

Note. * — statistically significant correlation.

оболочки желудка, что подтверждалось морфологически, а также возрастными сосудистыми изменениями [7].

Превышение верхней границы нормальных значений MCP-1 у 77,5% больных раком желудка, сильная положительная корреляционная связь со стадией опухолевого процесса указывают на диагностическую ценность определения его сывороточного уровня при данной локализации опухоли, согласуются с научными данными [3, 10, 16, 18] о возможности активации желудочного неоангиогенеза под действием MCP-1. Ранее установлено [13], что экспрессия MCP-1 в клетках аденокарциномы желудка возрастает с глубиной инвазии опухоли, как и плотность микрососудов и инфильтрации слизистой макрофагами; уровень MCP-1 достоверно коррелировал с васкуло-эндотелиальным фактором роста. По данным L.L. Tao et al. [16], экспрессия MCP-1 в опухолевой ткани коррелировала со стадией рака желудка, уровнем фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1 α), была сильно выражена у 66,2% больных, имеющих более низкую выживаемость.

Значимое уменьшение послеоперационного уровня MCP-1 у больных раком желудка указывает на радикальность хирургического вмешательства, тогда как сохранение повышенного количества MCP-1 у 4 (28,6%) больных с IV стадией опухолевого процесса — на паллиативный характер лечения и является неблагоприятным прогностическим фактором.

Уровень MCP-1 в сыворотке крови обследованных лиц был взаимосвязан с титрами САТ к СаgА *H. pylori* [4], что объясняется стимуляцией липополисахаридом клеточной стенки бактерии выработки данного цитокина клетками продуцентами [1, 12, 15].

Заключение

Определение сывороточного уровня MCP-1 при предраковых состояниях и раке желудка является диагностически ценным. Сопоставление значений показателя с титрами суммарных антител к цитотоксин-ассоциированному протеину *H. pylori* прогностически значимо, так как позволяет оценить выраженность индукционного сигнала к цитокинопродукции.

Список литературы/References

1. Азнабаева Л.Ф., Ганцева Х.Х., Афлятунова С.Ф. Моноцитарный хемотаксический белок в иммунопатогенезе хронической обструктивной болезни легких // Медицинская иммунология. 2011. Т. 13, № 4–5. С. 502–503. [Aznabayeva L.F., Gantseva H.H., Aflyatunova S.F. Monocyte chemotactic protein in immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, vol. 13, no. 4–5, pp. 502–503. (In Russ.)]
2. Бережная И.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология. 2009. Т. 11, № 2. С. 86–93. [Berezhnaya I.M. The role of cells of the immune system in the microenvironment of the tumor. II. Interaction of cells of the immunity system with other components of the microenvironment. *Onkologiya = Oncology*, 2009, vol. 11, no. 2, pp. 86–89. (In Russ.)]
3. Исакова С.С., Жармаханова Г.М., Дворацка М. Характеристика проангиогенных факторов и их патогенетическая роль // Наука и здравоохранение. 2013. № 6. С. 8–12. [Iskakova S.S., Zharmakhanova G.M., Dvoratska M. Characteristics of pro-angiogenic factors and their pathogenetic role. *Nauka i zdavookhranenie = Science and Health*, 2013, no. 6, pp. 8–12. (In Russ.)]
4. Курусин В.М., Матвеева Л.В. Гендерные различия микробиоты желудка при заболеваниях гастродуоденальной зоны // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016. № 2. С. 25–29. [Kurusin V.M., Matveeva L.V. Gender features changes of microbiota gastric at diseases gastroduodenal zone. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2016, vol. 126, no. 2, pp. 25–29. (In Russ.)]
5. Матвеева Л.В., Мосина Л.М. Роль цитокинов семейства интерлейкина-1 в желудочном канцерогенезе. Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 67, № 11. С. 59–65. [Matveeva L.V., Mosina L.M. The role of interleukin-1 and associated cytokines in gastric carcinogenesis. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Herald of the Russian Academy of Sciences*, 2012, vol. 67, no. 11, pp. 59–65. doi: 10.15690/vramn.v67i11.473 (In Russ.)]
6. Матвеева Л.В., Стенина М.А., Мосина Л.М. Цитокиновая регуляция ulcerogenesis слизистой оболочки гастро-дуоденальной зоны. Медицинская иммунология. 2013. Т. 15, № 2. С. 107–119. [Matveeva L.V., Stenina M.A., Mosina L.M. Cytokine regulation of ulcerogenesis in gastroduodenal mucosa. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, vol. 15, no. 2, pp. 107–119. doi: 10.15789/1563-0625-2013-2-107-118 (In Russ.)]
7. Никитина В.В., Захарова Н.Б. Значение MCP-1 как предиктора сосудистых нарушений // Саратовский научно-медицинский журнал. 2010. Т. 6, № 4. С. 786–790. [Nikitina V.V., Zaharova N.B. Value MCP-1 as predict vascular disturbances. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2010, vol. 6, no. 4, pp. 786–790. (In Russ.)]
8. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 4. С. 499–514. [Freidlin I.S., Sheikin Y.A. Endothelial cells as targets and producers of cytokines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, vol. 3, no. 4, pp. 499–514. (In Russ.)]
9. Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon. Cytokine Res.*, 2009, vol. 29, iss. 6, pp. 313–326. doi: 10.1089/jir.2008.0027
10. Kuroda T., Kitadai Y., Tanaka S., Yang X., Mukaida N., Yoshihara M., Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. *Clin. Cancer Res.*, 2005, vol. 11, no. 21, pp. 7629–7636. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0798

11. Li M., Knight D.A., Snyder A.L., Smyth M.J., Stewart T.Y. A role for CCL2 in both tumor progression and immunosurveillance. *Oncoimmunology*, 2013, vol. 2, no. 7: e25474. doi: 10.4161/onci.25474
12. Mori N., Ueda A., Geleziunas R., Wada A., Hirayama T., Yoshimura T., Yamamoto N. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF- κ B. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, no. 3, pp. 1280–1286. doi: 10.1128/IAI.69.3.1280-1286.2001
13. Ohta M., Kitadai Y., Tanaka S., Yoshiara M., Yasui W., Micaida N., Naruma K., Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int. J. Oncol.*, 2003, vol. 22, no. 4, pp. 773–778.
14. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature*, 2011, vol. 475, no. 7355, pp. 222–225. doi: 10.1038/nature10138
15. Shimoyama T., Everett S.M., Dixon M.F., Axon A.T., Crabtree J.E. Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J. Clin. Pathol.*, 1998, vol. 51, no. 10, pp. 765–770.
16. Tao L.L., Shi S.J., Chen L.B., Huang G.C. Expression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in gastric cancer and its relationship with tumor hypoxia. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 15, pp. 4421–4427. doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4421
17. Watanabe N., Shimada T., Ohtsuka Y., Hirashi H., Terano A. Proinflammatory cytokines and *Helicobacter pylori* stimulate CC-chemokine expression in gastric epithelial cells. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, vol. 48, no. 3, pp. 405–413.
18. Zhang J., Yan Y., Cui X., Zhang J., Yang Y., Li H., Wu H., Li J., Wang L., Li M., Liu X., Wang J., Duan X. CCL2 expression correlates with Snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer. *Pathol. Res. Pract.*, 2017, vol. 213, iss. 3, pp. 217–221. doi: 10.1016/j.prp.2016.12.013

Авторы:

Матвеева Л.В., к.м.н., доцент кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Капкаева Р.Х., аспирант 3 года обучения кафедры госпитальной терапии Медицинского института ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Чудайкин А.Н., аспирант 1 года обучения кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия;
Мишанина Л.С., соискатель, кафедра иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, г. Саранск, Россия.

Authors:

Matveeva L.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Kapkaeva R.Ch., Graduate Student of 3 Year of Study, Department of Hospital Therapy, Medical Institute National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Chudajkin A.N., Graduate Student of 1 Year of Study, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation;
Mishanina L.S., Applicant, Department of Immunology, Microbiology and Virology, Medical Institute National Research Mordovia State University, Saransk, Russian Federation.

КИСЛОРОДОЗАВИСИМЫЙ ФАГОЦИТОЗ МОНОЦИТОВ КРОВИ У ДЕТЕЙ С *HELICOBACTER PYLORI*-АССОЦИИРОВАННЫМ ЭРОЗИВНО- ЯЗВЕННЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ЖЕЛУДКА И 12-ПЕРСТНОЙ КИШКИ

О.А. Коленчукова, И.И. Гвоздев, Н.Н. Горбачева, И.С. Литвинова

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Резюме. Целью исследования было изучение кислородозависимого фагоцитоза моноцитов крови у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки с помощью хемилюминесцентного анализа. Объектами исследования служили моноциты крови, выделенные у 44 детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки в возрасте от 11 до 18 лет. В результате микроскопического исследования биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) из стандартных зон и краев язвенных дефектов были выделены 2 группы больных с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки: 1 группа — с наличием высокой степени обсемененности бактериями *Helicobacter pylori* и 2 группа — с низкой степенью обсемененности. Исследование люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови у больных с высокой степенью обсемененности слизистой желудка и 12-перстной кишки *H. pylori* показало достоверное повышение интенсивности и площади под кривой спонтанной реакции и площади под кривой в зимозан-индуцированном процессе относительно активности моноцитов в группе с низкой обсемененностью. В люцигенин-зависимой хемилюминесцентной реакции в группе больных с высокой обсемененностью *H. pylori* наблюдалось достоверное повышение времени выхода на пик в спонтанной реакции и зимозан-индуцированном процессе при повышении индекса активации по сравнению с фагоцитарной активностью моноцитов в группе с низкой обсемененностью. Дальнейшим этапом эксперимента было выявление CagA-позитивных штаммов *H. pylori* у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки. Исследование хемилюминесцентной активности моноцитов крови у больных с анти-CagA антителами показало достоверное повышение времени выхода на пик, интенсивности и площади под кривой в спонтанном процессе в люминол-зависимой реакции и времени выхода на пик и интенсивности в спонтанной хемилюминесцентной реакции, где активатором является люцигенин. Таким образом, в результате исследования было установлено повышение активности кислородозависимого фагоцитоза моноцитов крови у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки, ассоциированным *H. pylori* при повышении обсемененности бактериями *H. pylori*. Увеличение обсемененности бактериями *H. pylori* повышает степень воспаления СОЖ. При воспалении активные

Адрес для переписки:

Коленчукова Оксана Александровна
660022, Россия, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3г,
ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера.
Телефон: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62 (служебн.).
Факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

Contacts:

Oksana A. Kolenchukova
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, P. Zheleznyaka str., 3g,
Scientific Research Institute of Medical Problems of the North.
Phone: +7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62 (office).
Fax: +7 (391) 228-06-83.
E-mail: kalina-chyikova@mail.ru

Библиографическое описание:

Коленчукова О.А., Гвоздев И.Н., Горбачева Н.Н., Литвинова И.С.
Кислородозависимый фагоцитоз моноцитов крови у детей
с *Helicobacter pylori*-ассоциированным эрозивно-язвенным
поражением желудка и 12-перстной кишки // Инфекция и иммунитет.
2018. Т. 8, № 2. С. 157–162. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-157-162

Citation:

Kolenchukova O.A., Gvozdev I.N., Gorbacheva N.N., Litvinova I.S. Oxygen-
dependent phagocytosis of blood monocytes in children with *Helicobacter
pylori*-associated gastric and duodenal erosions and ulcer // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2,
pp. 157–162. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-157-162

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 16-44-240668 и Краевого государственного автономного учреждения
«Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

фагоциты интенсивнее генерируют образование активных форм кислорода, свободных радикалов и продуктов перекисного окисления. Присутствие CagA-положительных штаммов *H. pylori*, как правило, сопровождается более высокой степенью воспалительной активности, чем CagA-негативных. В результате такого воздействия повышается функциональная активность моноцитов, поскольку именно они являются «профессиональными» фагоцитами. Способность к фагоцитозу в них выражена больше, чем у других лейкоцитов.

Ключевые слова: кислородозависимый фагоцитоз, моноциты крови, *Helicobacter pylori*, обсемененность, эрозивно-язвенное поражение желудка.

OXYGEN-DEPENDENT PHAGOCYTOSIS OF BLOOD MONOCYTES IN CHILDREN WITH *HELICOBACTER PYLORI*-ASSOCIATED GASTRIC AND DUODENAL EROSIONS AND ULCER

Kolenchukova O.A., Gvozdev I.N., Gorbachova N.N., Litvinova I.S.

Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences «Scientific Research Institute for Medical Problems of the North», Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the research is to study oxygen-dependent phagocytosis of blood monocytes in children with gastric and duodenal erosions and ulcers by chemiluminescence analysis. The subjects of the research were blood monocytes, extracted from blood in 44 children with gastric and duodenal erosions and ulcers in the ages from 11 to 18 years. Microscopic tests for the biopsies of gastric mucosa of both standard regions and edges of ulcer defects had resulted in the determination of 2 groups of the patients with gastric and duodenal erosions and ulcers. The 1st group was represented by *Helicobacter pylori* high dissemination. As for the 2nd group, the patients showed low bacterization. The tests for luminol-dependent hemiluminescence of blood monocytes in patients with *H. pylori* high dissemination of gastric and duodenal mucosa demonstrated the significant increase of the intensity and the growth of areas both under the curve of spontaneous response and under the curve in the zimosan-induced process as compared to the monocyte activity in the group with low dissemination. Following the lucigenin-dependent chemiluminescence reactions in the group with *H. pylori* high dissemination we had found significant increase of the time of approaching the peak in both spontaneous response and zimosan-induced processes while the activation index was higher in comparison with phagocyte activities of monocytes in the group with low dissemination. Further stage of the research was to identify CagA-positive strains of *H. pylori* in the children with gastric and duodenal erosions and ulcers. Studying chemiluminescence activity of blood lymphocytes in the patients with anti-CagA antibodies we found the true increase of the time of reaching the peak, the intensity and the area under the curve in spontaneous process in luminol-dependent response and the time of reaching intensity peak and the intensity of spontaneous chemiluminescence reaction, lucigenin being an activator. So we marked the increase of the activity of oxygen-dependent phagocytosis of blood monocytes in children with *H. pylori* associated with gastric and duodenal erosions and ulcers related to *H. pylori* increased bacterization. The growth of *H. pylori* dissemination results in the higher stage of stomach mucosa inflammation. Therefore active phagocytes generate more intensively the formation of active forms of oxygen, free radicals and the products of peroxide oxidation. CagA-positive strains of *H. pylori*, as a rule, are associated with the higher level of inflammatory activity than CagA-negative ones. As a result of such influence the functional activity of monocytes increases, because they are «professional» phagocytes. The ability to perform phagocytosis is better expressed in them as compared to other leukocytes.

Key words: oxygen-dependent phagocytosis, blood monocytes, *Helicobacter pylori*, dissemination, gastric erosions and ulcer.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) в настоящее время рассматривается в качестве ведущего этиопатогенетического фактора формирования язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки у детей и взрослых [5]. Было показано, что около 80% случаев язвенной болезни желудка и почти 100% случаев двенадцатиперстной кишки ассоциированы с *H. pylori*-инфекцией. В то же время, хотя активная хеликобактерная инфекция распространена как минимум у 50% населения земного шара, лишь сравнительно небольшая часть (около 20%) страдает язвенной болезнью [4]. Рядом авторитетных зарубежных исследователей было высказано предположение, что ответственность за формирование наиболее тяжелых форм гастродуоденальной патологии несут так называемые факторы патогенности бактерий, в связи с чем, штаммы *H. pylori*, ассоциированные с язвенной болезнью, получили названия

«ультцерогенных» [2, 4]. Современная концепция ультцерогенеза предполагает нарушение динамического равновесия между факторами агрессии и факторами защиты слизистой оболочки. *H. pylori* хорошо вписывается в общую схему этой концепции. Колонизация слизистой оболочки *H. pylori* может приводить к образованию язвенных дефектов, с одной стороны, за счет ферментной активности разжижающей пристеночную слизь, с другой стороны, за счет повреждающего действия цитотоксинов на эпителий. Колонизация *H. pylori* желудка приводит к активированию макрофагов и нейтрофилов в слизистой оболочке. При тесном контакте *H. pylori* с эпителиоцитом, последний начинает вырабатывать цитокины, наиболее важный из которых — интерлейкин-8 (IL-8). Этот цитокин активизирует фагоциты, регулирует хемотаксис и хемокинез, а также процессы осво-

бождения лизосомальных ферментов [6, 13, 15]. Для того, чтобы добраться до микроба, фагоцит должен пройти через эпителий. В результате развивается каскад химических реакций с образованием соединений активного кислорода, при этом развивается воспалительный процесс различной степени активности [10, 16].

Таким образом, целью исследования было изучение кислородозависимого фагоцитоза моноцитов крови у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки с помощью хемилюминесцентного анализа.

Материалы и методы

Объектами исследования служили моноциты крови, выделенные у 44 детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки в возрасте от 11 до 18 лет.

Для постановки диагноза использовались традиционные методы клинического обследования (анализ жалоб, сбор анамнеза, данные общего осмотра), методы лабораторной диагностики (клинический анализ крови, мочи, биохимический анализ крови). Кроме этого, применялись специализированные инструментальные методы — эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, дыхательный уреазный карбамид-тест с использованием системы «Хелик-тест» для верификации *H. pylori*. Для определения специфического Нр-антигена был использован stool test (в кале с помощью моноклональных антител), гистологическое исследование биоптата и регистрации специфических антител в плазме крови (ИФА). При регистрации суммарных антител (IgA, IgG, IgM) к антигену CagA *H. pylori* в сыворотке крови методом ИФА с помощью набора «*Helicobacter pylori*-CagA-антитела-ИФА-Бест».

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из мононуклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколлюрографина ($\rho = 1,077$) [11]. Исследование кислород-зависимого фагоцитоза моноцитов крови проводили хемилюминесцентным методом.

Исследование интенсивности «респираторного взрыва» моноцитов осуществляли через определение активности люцигенин- и люминол-зависимой спонтанной зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Хемилюминесцентная активность оценивается в течение 90 мин на кюветном биолуцинометре (Turner, США). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение интенсивности (I_{max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади инду-

цированной хемилюминесценции к площади спонтанной ($S_{инд.}/S_{спонт.}$) и определяли как индекс активации [9].

Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациента. Протокол обследования больных и здоровых людей (контрольная группа) соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике НИИ МПС.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C_{25} и C_{75}). Нормальность распределения проверялась методом Колмогорова—Смирнова. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна—Уитни, зависимых выборок с помощью критерия Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

В результате микроскопического исследования биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ) из стандартных зон и краев язвенных дефектов (световая микроскопия, окраска общепринятым методом по Романовскому—Гимзе и азур-эозинном) были выделены 2 группы больных с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки: 1 группа — наличие высокой степени обсемененности бактериями *H. pylori* и 2 группа — низкая степень обсемененности. Сравнительное изучение фагоцитарной активности моноцитов крови проведено в группах с высокой и низкой обсемененностью бактериями *H. pylori*.

Хемилюминесцентное определение функциональной активности моноцитов крови базировалось на определении базовой активности и резервных возможностей клеток при воздействии на них неспецифического индуктора в виде зимозана. Отдельно исследована способность фагоцитов к образованию супероксидного аниона (O_2^-) при активации люцигенином и образование общего пула свободных радикалов кислорода при активации люминолом. Супероксидный анион-радикал образуется в результате ферментативных реакций и относится к первичным радикалам кислорода являясь источником для вторичных радикалов (H_2O_2 , OH^\bullet , 1O_2 , $HClO$) выделяемых фагоцитами [12].

Исследование люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов крови у больных с высокой обсемененностью слизистой желудка и 12-перстной кишки *H. pylori* показало достоверное повышение интенсивности и площади

Таблица 1. Показатели хемилюминесцентной реакции моноцитов крови у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки, ассоциированной с обсемененностью бактериями *H. pylori*

Table 1. Indicators of chemiluminescence reaction of monocytes of blood at children with erosive ulcer damage of a stomach and duodenum of *H. pylori* associated with an the increased concentration bacteria

Показатели Characteristics	Высокая обсемененность <i>H. pylori</i> Increased concentration <i>H. pylori</i> N = 22	Низкая обсемененность <i>H. pylori</i> Low concentration <i>H. pylori</i> N = 22	P
Люминол-зависимая реакция/Luminol-dependent reaction			
Спонтанная реакция/Spontaneous reaction			
T _{max} (с)	1010 (575–1694)	547 (103–1637)	
I _{max} (о.е.)	743 (231–1728)	329 (258–449)	= 0,034
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	269,1 (54,0–618,2)	121,9 (61,9–397,0)	= 0,034
Зимозан-индуцированная реакция/Zimozan-induced reaction			
T _{max} (с)	1166 (855–1819)	887 (186–1482)	
I _{max} (о.е.)	2291 (219–8479)	409 (292–1468)	
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	731,6 (84,1–2083,0)	121,9 (61,8–397,1)	= 0,023
ИА/IA	2 (1–3)	1 (1–2)	
Люцигенин-зависимая реакция/Lucigenin-induced reaction			
Спонтанная реакция/Spontaneous reaction			
T _{max} (с)	1201 (608–1386)	461 (68–1141)	= 0,004
I _{max} (о.е.)	285 (203–404)	241 (190–362)	
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	116,9 (70,3–163,1)	95,3 (64,1–154,0)	
Зимозан-индуцированная реакция/Zimozan-induced reaction			
T _{max} (с)	1669 (1314–2092)	760 (130–1424)	= 0,009
I _{max} (о.е.)	595 (212–1326)	276 (216–681)	
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	197,3 (55,3–391,0)	111,5 (66,5–208,2)	
ИА/IA	2 (2–3)	1 (1–1)	= 0,013

Таблица 2. Показатели хемилюминесцентной реакции моноцитов крови у детей с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *H. pylori*, с анти-CagA серологическим иммунным ответом

Table 2. Indicators of chemiluminescence reaction of monocytes of blood at children with erosive ulcer damage of a stomach and duodenum of *H. pylori* associated with anti-CagA serological immune response

Показатели Characteristics	CagA-отрицательные CagA-negative N = 23	CagA-положительные CagA-positive N = 21	P
Люминол-зависимая реакция/Luminol-dependent reaction			
Спонтанная реакция/Spontaneous reaction			
T _{max} (с)	500 (68–1270)	1010 (234–1694)	= 0,004
I _{max} (о.е.)	323 (159–735)	750 (231–1728)	= 0,0497
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	127,9 (54,1–267,2)	254,7 (52,6–618,2)	= 0,0497
Зимозан-индуцированная реакция/Zimozan-induced reaction			
T _{max} (с)	411 (302–1347)	1165 (855–1819)	
I _{max} (о.е.)	644 (179–2993)	1041 (219–5234)	
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	180,8 (53,3–767,4)	326,6 (84,1–1451,0)	
ИА/IA	2 (1–4)	1 (1–3)	
Люцигенин-зависимая реакция/Lucigenin-dependent reaction			
Спонтанная реакция/Spontaneous reaction			
T _{max} (с)	548 (109–1386)	1155 (80–1370)	= 0,037
I _{max} (о.е.)	183 (149–308)	288 (203–404)	= 0,044
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	70,3 (39,6–134,1)	120,4 (53,0–163,1)	
Зимозан-индуцированная реакция/Zimozan-induced reaction			
T _{max} (с)	1314 (384–1512)	1721 (1097–2547)	
I _{max} (о.е.)	408 (150–867)	464 (144–1058)	
S _{max} × 10 ⁴ (о.е.)	145,6 (55,3–311,1)	101,8 (40,4–264,8)	
ИА/IA	1 (1–3)	2 (1–2)	

под кривой спонтанной реакции и площади под кривой в зимозан-индуцированном процессе относительно активности моноцитов в группе с низкой обсемененностью (табл. 1). В люцигенин-зависимой хемилюминесцентной реакции в группе больных с высокой обсемененностью *H. pylori* наблюдается достоверное повышение времени выхода на пик в спонтанной реакции и зимозан-индуцированном процессе при повышении индекса активации по сравнению с фагоцитарной активностью моноцитов в группе с низкой обсемененностью.

Дальнейшим этапом эксперимента было выявление CagA-позитивных штаммов *H. pylori* у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки. Гистологическая картина СОЖ у детей с анти-CagA антителами характеризуется более тяжелой степенью деструкции слизистой оболочки с более выраженными признаками воспаления (в первую очередь тяжелую степень нейтрофильной инфильтрации, а также наличие лимфоидных фолликулов) в сравнении с серонегативными пациентами. Цитотоксин-ассоциированный ген CagA был одним из первых токсинов *H. pylori*, с которым связывали его патогенность. CagA-продукт одного из генов «островка патогенности» *H. pylori* [6].

Исследование хемилюминесцентной активности моноцитов крови у больных с анти-CagA антителами показало достоверное повышение времени выхода на пик, интенсивности и площади под кривой в спонтанном процессе в люминол-зависимой реакции и времени выхода на пик и интенсивности в спонтанной хемилюминесцентной реакции где активатором является люцигенин (табл. 2).

Обсуждение

В результате исследования было установлено повышение активности кислород-зависимого фагоцитоза моноцитов крови у детей с эрозивно-язвенным поражением желудка и 12-перстной кишки, ассоциированным с *H. pylori*, при повышении обсемененности бактериями *H. pylori*. «Колонизаторские» способности *H. pylori* во многом обусловлены его высокой мобильностью: благодаря спиралевидной форме и наличию мощных жгутиков он может очень быстро проникать внутрь защитного слоя вязкий слизи. Уреаза, активируя моноциты и нейтрофилы, выступая в качестве аттрактанта лейкоцитов, стимулирует секрецию цитокинов, образование

оксида азота и радикалов кислорода, усиливает воспалительный процесс [7]. Увеличение обсемененности бактериями *H. pylori* повышает степень воспаления СОЖ. При воспалении активные фагоциты интенсивнее генерируют образование активных форм кислорода, свободных радикалов и продуктов перекисного окисления.

Цитотоксин-ассоциированный ген CagA был одним из первых токсинов *H. pylori*, с которым связывали его патогенность. CagA — продукт одного из генов «островка патогенности» *H. pylori* [13]. CagA, благодаря гомологичности компонентам IV типа секреторной системы эпителия, инъецируется в клетки хозяина, где подвергается дальнейшему фосфорилированию. CagA способствует изменению цитоскелета эпителиальных клеток, в частности формированию пьедестала при адгезии *H. pylori* к эпителию СОЖ. CagA, попадая в эпителий, стимулирует внутриклеточную сигнальную систему SHP-2, выработку провоспалительного хемокина IL-8, активирующего процессы миграции нейтрофилов в СОЖ и способствующего активации и транслокации в ядро основного провоспалительного белка NF- κ B, где под его воздействием включаются гены, обеспечивающие дальнейшую продукцию провоспалительных цитокинов: IL-1 β , TNF α и IFN γ . CagA (+) штаммы активируют рецептор эпителиального фактора роста (EGFR), который в свою очередь влияет на экспрессию генов, регулирующих процессы апоптоза. CagA-позитивные штаммы *H. pylori*, как правило, сопровождаются более высокой степенью воспалительной активности, чем CagA-негативные. В результате такого воздействия повышается функциональная активность моноцитов, поскольку именно они являются «профессиональными» фагоцитами. Способность к фагоцитозу в них выражена больше, чем у других лейкоцитов. Характерной особенностью моноцитов является способность к процессингу и презентации фагоцитированных антигенов в комплексе с МНС II [1, 3, 14]. Такие представленные антигены могут распознаваться Т-лимфоцитами, причем функции моноцитов и Т-клеток взаимосвязаны: моноциты могут активировать Т-клетки и получать от них активационные сигналы [15, 16], в результате чего наблюдается клеточно-опосредованный механизм активации иммунитета (Th1-тип), приводящий к дальнейшему прогрессированию воспалительной реакции. Кроме того, макрофаги способны и напрямую фагоцитировать и обезвреживать *H. pylori* [8].

Список литературы/References

1. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом // Медицинская иммунология. 2010. Т. 12, № 4–5. С. 437–440. [Kolenchukova O.A., Savchenko A.A., Smirnova S.V. Features of luminol- and lucigenin-induced chemiluminescence of neutrophilic granulocytes in patients with chronic rhinosinusitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, vol. 12, no. 4–5, pp. 437–440. doi: 10.15789/1563-0625-2010-4-5-437-440 (In Russ.)]

2. Маев И.В., Кочетов С.А. Клиническое значение инфекции *Helicobacter pylori* у пациентов с железодефицитной анемией: особенности комплексного подхода к терапии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016. Т. 26, № 1. С. 29–36. [Mayev I.V., Kochetov S.A. Clinical significance of *Helicobacter pylori* infection in iron-deficiency anemia: features of comprehensive treatment approach. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* = *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2016, vol. 26, no. 1, pp. 29–36. (In Russ.)]
3. Нестерова И.В., Швыдченко И.Н., Фомичева Е.В., Синельникова Е.Ю., Роменская В.А., Рожкова Г.Г., Фесенко И.В. Фенотипические и функциональные характеристики нейтрофильных гранулоцитов человека в норме // Наука Кубани. 2007. № 4. С. 38–43. [Nesterova I.V., Shvydchenko I.N., Fomicheva E.V., Sinelnikova E.Yu., Romenskaya V.A., Rozhkova G.G., Fesenko I.V. Phenotypic and functional characteristics of human neutrophilic granulocytes are normal. *Nauka Kubani* = *Science of Kuban*, 2007, no. 4, pp. 38–43. (In Russ.)]
4. Нижевич А.А., Кучина Е.С., Ахмадеева Э.Н. Значение анти-CagA серологического иммунного ответа у детей с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированной с *Helicobacter pylori* // Фундаментальные исследования. 2012. № 4. С. 212–215. [Nizhevich A.A., Kuchina E.S., Akhmadeeva E.N. Significance of anti-CagA serological immune response in children with gastric and duodenal ulcer associated with *Helicobacter pylori*. *Fundamental'nye issledovaniya* = *Fundamental Research*, 2012, no. 4, pp. 212–215. (In Russ.)]
5. Сафина Д.Д., Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А. Эрадикационная терапия *Helicobacter pylori*: настоящее и будущее // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016. № 11 (135). С. 84–93. [Safina D.D., Abdulkhakov S.R., Abdulkhakov R.A. Eradication therapy of *Helicobacter pylori*: present and future. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya* = *Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2016, no. 11 (135), pp. 84–93. (In Russ.)]
6. Шанова Н.О., Прохорова Л.В. Возможности повышения эффективности эрадикации *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016. Т. 26, № 2. С. 11–18. [Schanova N.O., Prokhorova L.V. Improvement of *Helicobacter pylori* eradication efficacy at stomach and duodenum peptic ulcers. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii* = *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2016, vol. 26, no. 2, pp. 11–18. (In Russ.)]
7. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, vol. 152, iss. 1, pp. 32–41. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.004
8. Gordon S., Pluddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol.*, 2017, vol. 15, no. 1: 53, 18p. doi: 10.1186/s12915-017-0392-4
9. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*, 2012, vol. 381, no. 1, pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jim.2012.04.003
10. Lauvau G., Chorro L., Spaulding E., Soudja S.M. Inflammatory monocyte effector mechanisms. *Cell. Immunol.*, 2014, vol. 291, iss. 1–2, pp. 32–40. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.07.007
11. Luiders J., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flowcytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, vol. 10, no. 2, pp. 102–108. doi: 10.1532/LH96.04121
12. Nocca G., De Sole P., Gambarini G., De Palma F., Parziale V., Giardina B., Lupi A. Alteration of monocytic cell oxidative burst caused by methacrylic monomers present in dental materials: a chemiluminescence study. *Luminescence*, 2006, vol. 21, iss. 3, pp. 202–206. doi: 10.1002/bio.909
13. Pilotto A., Franceschi M. *Helicobacter pylori* infection in older people. *World J. Gastroenterol.*, 2014, vol. 20, no. 21, pp. 6364–6373. doi: 10.3748/wjg.v20.i21.6364
14. Skrzeczyńska-Moncznik J., Bzowska M., Loseke S., Grage-Griebenow E., Zembala M., Pryjma J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.*, 2008, vol. 67, iss. 2, pp. 152–159. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
15. Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, vol. 11, pp. 762–774. doi: 10.1038/nri3070
16. Strehl C., Fangradt M., Fearon U., Gaber T., Buttgereit F., Veale D.J. Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 95, iss. 2, pp. 233–241. doi: 10.1189/jlb.1212627

Авторы:

Коленчукова О.А., д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Гвоздев И.Н., младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Горбачева Н.Н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Литвинова И.С., аспирант, ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Gvozdev I.N., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Gorbacheva N.N., Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Litvinova I.S., PhD Candidate, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.09.2017
Отправлена на доработку 27.02.2018
Принята к печати 22.03.2018

Received 08.09.2017
Revision received 27.02.2018
Accepted 22.03.2018

DIFFICULTIES IN IDENTIFICATION OF *COMAMONAS KERSTERSII* STRAINS ISOLATED FROM INTESTINAL MICROBIOTA OF RESIDENTS OF REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIAN FEDERATION

E.V. Voitenkova, Z.N. Matveeva, M.A. Makarova, S.A. Egorova, A.V. Zabrovskaya, L.V. Suzhaeva, E.V. Zueva, L.A. Kaftyreva

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

Abstract. The *Comamonas* genus, described in 1985, included one species — *Comamonas terrigena*. At present, the *Comamonas* genus includes 21 species. The ability of *Comamonas* to survive in environmental objects (samples of water, soil and plants), including hospital environment and medical equipment, allows them to be considered as opportunistic microorganisms. The purpose of the research was to study the biological properties and antimicrobial susceptibility of *Comamonas kerstersii* strains isolated from fecal samples of healthy people living in Saint Petersburg (Russian Federation) and the Republic of Guinea. The study was carried out in the laboratory of enteric infections of the St. Petersburg Pasteur Institute. 1532 fecal samples were obtained from residents of St. Petersburg and 46 samples from residents of the Republic of Guinea. The generic and species identification of the isolated microorganisms was carried out using routine biochemical tests, the NEFERM test²⁴ commercial test system (MIKROLATEST, Erba Rus, Russia) and Vitek 2 Compact (BioMerieux). The difficult for identification microorganisms were studied by MALDI-TOF mass spectrometry, on a “Microflex LRF” mass-spectrometer. Antimicrobial susceptibility was determined by the gradient method with MICEvaluator™ (OXOID, UK) on Müller–Hinton agar (Russia). In the intestine microbiota of 1532 St. Petersburg residents among the opportunistic microorganisms two strains of *C. kerstersii* were isolated (0.13%). In a survey of 46 residents of the Republic of Guinea in 8 cases (17.4%) *C. kerstersii* were isolated. The identification of *C. kerstersii* strains using various methods and biochemical tests has shown different results: routine biochemical tests allowed the strains to be assigned to the group of non-fermenting gram-negative bacteria; NEFERM test²⁴ kit identified all strains as *C. testosteroni*; VITEC 2 referred all strains to *C. testosteroni*; using mass spectrometry with a coincidence ratio of 2.19–2.33, all strains were identified as *C. kerstersii*. It should be taken into account that the *C. kerstersii* bacteria cannot be identified by the tests of NEFERM test²⁴ kit and the GN VITEC 2 card, since only the *C. testosteroni* is represented in the databases of both methods. The taxonomic base of mass spectrometry includes reference spectra of five species of *Comamonas* from 21 known ones, including *C. kerstersii*. Strains isolated from the inhabitants of the Republic of Guinea were unsusceptible to at least one tested antibiotic: ciprofloxacin (4 strains), tetracycline (5 strains) and trimethoprim/sulfamethoxazole (5 strains), almost all strains being

Адрес для переписки:

Кафтырева Лидия Алексеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: (812) 232-48-83 (служебн.).
Факс: (812) 233-20-92.
E-mail: kafflidia@mail.ru

Contacts:

Lidiya A. Kaftyreva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-48-83 (office).
Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: kafflidia@mail.ru

Библиографическое описание:

Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Макарова М.А., Егорова С.А.,
Забровская А.В., Сузаева Л.В., Зуева Е.В., Кафтырева Л.А. Выделение
и особенности идентификации *Comamonas kerstersii* при изучении
микробиоты кишечника жителей Российской Федерации и Гвинейской
Республики // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 163–168.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-163-168

Citation:

Voitenkova E.V., Matveeva Z.N., Makarova M.A., Egorova S.A.,
Zabrovskaya A.V., Suzhaeva L.V., Zueva E.V., Kaftyreva L.A. Difficulties
in identification of *Comamonas kerstersii* strains isolated from intestinal
microbiota of residents of Republic of Guinea and Russian Federation //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018,
vol. 8, no. 2, pp. 163–168. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-163-168

simultaneously unsusceptible to several antibiotics: ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole (2 strains), tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole (2 strains), ciprofloxacin and tetracycline (1 strain). One strain was unsusceptible to ciprofloxacin, tetracycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole.

Key words: *microbiome of the intestines, non-fermenting bacteria, Comamonas kerstersii, MALDI-TOF, antimicrobial resistance.*

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ *COMAMONAS KERSTERSII* ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЖИТЕЛЕЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н., Макарова М.А., Егорова С.А., Забровская А.В., Сужаева Л.В., Зуева Е.В., Кафтырева Л.А.

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

Резюме. Род *Comamonas*, описанный в 1985 году, включал один вид — *Comamonas terrigena*. В настоящее время род *Comamonas* включает 21 вид. Способность бактерий рода *Comamonas* выживать в объектах внешней среды (пробах воды, почвы и растений), в том числе во влажных условиях госпитальной среды и на медицинском оборудовании, позволяет считать их условно-патогенными микроорганизмами. Цель исследования состояла в изучении биологических свойств и чувствительности к антибиотикам штаммов *Comamonas kerstersii*, выделенных из проб испражнений здоровых людей, проживающих в Санкт-Петербурге и Гвинейской Республике. Работа проводилась в лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург. Исследованы 1532 пробы фекалий, полученных от жителей Санкт-Петербурга и 46 проб жителей Гвинейской Республики. Родовую и видовую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили, используя рутинные биохимические тесты; коммерческую тест-систему «НЕФЕРМ тест24» (MIKROLATEST, Эрба Рус, РФ) и бактериологический анализатор Vitek 2 Compact (BioMerieux). Трудноидентифицируемые микроорганизмы исследовали масс-спектрометрическим методом на MALDI-TOF масс-спектрометре «Microflex LRF». Чувствительность к антибиотикам определяли методом градиентных концентраций с полосками M.I.C.Evaluator™ (OXOID, Великобритания) на агаре Мюллера–Хинтон (НИЦФ, Россия). В составе микробиоты кишечника у 1532 жителей Санкт-Петербурга были выделены 2 штамма *C. kerstersii* (0,13%). При обследовании 46 жителей Гвинейской Республики в 8 случаях (17,4%) были выделены *C. kerstersii*. Идентификация штаммов *C. kerstersii* с использованием различных методов дала различные результаты: рутинные биохимические тесты позволили отнести штаммы к группе неферментирующих грамотрицательных бактерий; «НЕФЕРМ тест24» идентифицировал штаммы как *C. testosteroni*; анализатор VITEC 2 отнес штаммы к *C. testosteroni*; методом масс-спектрометрии с коэффициентом совпадения 2,19–2,33 все штаммы идентифицированы как *C. kerstersii*. Следует учесть, что бактерии *C. kerstersii* не могут быть идентифицированы тестами, входящими в набор «НЕФЕРМ тест24» и карту GN VITEC 2, так как в базах данных обоих методов представлена характеристика только *C. testosteroni*. Таксономическая база масс-спектрометрии включает эталонные спектры пяти видов *Comamonas* из 21 известных, в том числе и *C. kerstersii*. Штаммы, выделенные от жителей Гвинейской Республики, характеризовались нечувствительностью хотя бы к одному тестируемому антибиотику: ципрофлоксацину (4 штамма), тетрациклину (5 штаммов) и триметоприм/сульфаметоксазолу (5 штаммов), причем практически все штаммы характеризовались одновременно нечувствительностью к нескольким АМП: ципрофлоксацину и триметоприм/сульфаметоксазолу (2 штамма), тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу (2 штамма), ципрофлоксацину и тетрациклину (1 штамм). Один штамм был нечувствителен одновременно к ципрофлоксацину, тетрациклину и триметоприм/сульфаметоксазолу.

Ключевые слова: *микробиота кишечника, неферментирующие бактерии, Comamonas kerstersii, MALDI-TOF, антимикробная резистентность.*

Introduction

The group of non-fermenting bacteria includes chemo-organotrophic Gram-negative microorganisms belonging to different genera and families, united in one group due to the lack of ability to carry out fermentation processes (utilization of carbohydrates in anaerobic conditions). In group of non-fermenting bacteria *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera have the most important clinical significance as agents

of health-care associated infections. In the taxonomy of pseudomonads, significant changes have taken place in recent years: bacteria that previously belonged to *Pseudomonas* are now divided into five main clusters, which are separated into independent genera or families, on the basis of homology studies using the rRNA hybridization method [18]. The first group includes bacteria of the *Pseudomonas* genus. Microorganisms belonging to the third rRNA homologous group are classified as a family

of *Comamonadaceae*, including *Comamonas*, *Delftia* and *Acidovorax* genera. The *Comamonas* genus, described in 1985, included one species — *Comamonas terrigena* [10]. Later, a detailed study of strains belonging to this genus allowed them to be divided into three distinct species: *C. terrigena*, *C. aquatica*, *C. kerstersii* [22]. At present, the *Comamonas* genus includes 21 species [14]. Bacteria of the *Comamonas* genus — aerobic, non-spore-forming gram-negative rods, mobile due to the presence of polar flagella, oxidase and catalase positive, grow well on simple and differential diagnostic nutrient media, do not oxidize or ferment carbohydrates, optimum growth temperature is 35–40°C. The ability of bacteria of the *Comamonas* genus to survive in environmental objects (samples of water, soil and plants), including hospital environment and medical equipment, allows them to be considered as opportunistic microorganisms [15].

The purpose of the research was to study the biological properties and antimicrobial susceptibility of *C. kerstersii* strains isolated from fecal samples of healthy people living in Saint Petersburg (Russian Federation) and the Republic of Guinea.

Materials and methods

The study was carried out in the laboratory of enteric infections of the St. Petersburg Pasteur Institute. 1532 fecal samples were obtained from residents of St. Petersburg and 46 samples from residents of the Republic of Guinea. The residents were clinically healthy and showed no signs of gastrointestinal disease during the 6 months preceding the study. Microorganisms (families of Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., yeast-like fungi of the genus *Candida*, non-fermenting bacteria, etc.) in Ig of feces were determined by the quantitative bacteriological method on various selective and differential-diagnostic media [1, 3]. The generic and species identification of the isolated microorganisms was carried out using routine biochemical tests, the NEFERM test24 commercial test system (MIKROLATEST, Erba Rus, Russia), the results were interpreted using the software supplied by the manufacturer. The difficult for identification microorganisms were studied by mass spectrometry. The spectra of the cells samples were acquired in linear positive mode using the "Microflex LRF" (Bruker Daltonik, Germany) mass spectrometer. Each spectrum was acquired using the FlexControl 3.3 software (Bruker Daltonics, Germany) in an automatic mode. The identification was carried out on the basis of the MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Germany) software by comparing the mass spectra of each test sample with the reference spectra data from the taxonomic base and calculating the coincidence coefficients presented as scores. In addition, the identification of strains was carried out using the GN card for gram-negative microorganisms of the bacteriological analyzer Vitek 2 Compact (BioMerieux, France).

Antimicrobial susceptibility of *C. kerstersii* strains (minimum inhibitory concentrations, MIC) was determined by the gradient concentration method with MICEvaluator™ (OXOID, UK) strips on Müller-Hinton agar (Russia). The test included antibiotics from the group of expanded-spectrum cephalosporins (ceftazidime, cefotaxime, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem), fluoroquinolones (ciprofloxacin), aminoglycosides (gentamicin, amikacin), tetracycline, chloramphenicol and trimethoprim/sulfamethoxazole. Interpretation of the results was carried out according to the CLSI M100-S27 guidelines, Table 2B-5 "Minimal Inhibitory Concentration Breakpoints (µg/ml) for Other Non-Enterobacteriaceae", where we found the breakpoints of the MIC for microorganisms not belonging to the *Enterobacteriaceae* family: *Pseudomonas* spp. and other non-fermenting glucose, Gram-negative rods (with the exception of *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* and *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* spp., and *Vibrio* spp.) [9]. Interpretation criteria according to CLSI M100-S27 are: ceftazidime, cefotaxime and cefepime: S ≤ 8.0 mg/l, R ≥ 32.0 mg/l; imipenem and meropenem: S ≤ 4.0 mg/l, R ≥ 16.0 mg/l; ciprofloxacin: S ≤ 1.0 mg/l, R ≥ 4.0 mg/l; gentamycin: S ≤ 4.0 mg/l, R ≥ 16.0 mg/l; amikacin: S ≤ 16.0 mg/l, R ≥ 64.0 mg/l; tetracycline: S ≤ 4.0 mg/l, R ≥ 16.0 mg/l; chloramphenicol: S ≤ 8.0 mg/l, R ≥ 32.0 mg/l; trimethoprim / sulfamethoxazole: S ≤ 2/38 mg/l, R ≥ 4/76 mg/l.

Results

In the intestine microbiota of 1532 St. Petersburg residents among the opportunistic microorganisms, *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus aureus* were isolated most frequently, the detection rate was 20 and 16.7%, respectively. Findings of non-fermenting bacteria were less often. *Pseudomonas aeruginosa* was found only in 0.9% of cases. Other species of the *Pseudomonas* genus (*P. monteilii*, *P. putida*) were found in single cases. Two strains of *C. kerstersii* were also isolated (0.13%).

In a survey of 46 residents of the Republic of Guinea from the opportunistic microorganisms *Staphylococcus aureus* (34.8%) and *Klebsiella* spp. were also detected with the highest frequency (26.1%). In 8 cases (17.4%) non-fermenting bacteria were isolated, which were identified as *C. kerstersii*.

In the intestine microbiota of all the residents, *C. kerstersii* strains were found in the amounts exceeding the normal quantities (in St. Petersburg residents it was 10⁶ CFU/g, in the residents of the Republic of Guinea — from 10⁶ to 10⁹ CFU/g). In all cases, *C. kerstersii* strains were found in association with other opportunistic microorganisms (*Klebsiella* spp., *Candida* spp., *Hafnia alvei*, non-fermenting bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* spp.). The identi-

Table. MIC of antibiotics for *Comamonas kerstersii* strains

No.	MIC, mg/ml										
	ceftazidim	cefotaxim	cefepim	imipenem	meropenem	ciprofloxacin	gentamicin	amikacin	tetracycline	chloramphenicol	trimethoprim/ sulfamethoxazol
1	2.0	4.0	1.5	0.125	0.125	> 32.0	2.0	4.0	8.0	3.0	> 32.0
2	1.0	1.0	0.38	0.125	0.125	0.06	2.0	3.0	128.0	1.0	> 32.0
3	0.75	0.75	0.38	0.125	0.125	8.0	2.0	4.0	4.0	1.5	> 32.0
4	0.5	0.75	0.25	0.125	0.125	4.0	2.0	4.0	4.0	1.5	> 32.0
5	0.75	0.5	0.25	0.125	0.125	0.06	2.0	3.0	8.0	1.0	0.38
6	0.75	0.75	0.38	0.125	0.125	0.06	2.0	3.0	6.0	1.5	> 32.0
7	0.75	1.0	0.5	0.19	0.19	4.0	2.0	4.0	8.0	1.0	1.5
8	0.75	1.0	0.38	0.125	0.125	0.12	2.0	3.0	4.0	1.5	0.25
9	0.75	1.0	0.38	0.125	0.19	0.12	2.0	4.0	4.0	1.5	0.38

fication of *C. kerstersii* strains using various methods and biochemical tests has shown different results:

1. Routine biochemical tests allowed the strains to be assigned to the group of non-fermenting bacteria (gram-negative, mobile, catalase and oxidase-positive, non-fermenting carbohydrates bacteria).
2. Using the tests included in the NEFERM test 24 kit, the strains were identified as *C. testosteroni*.
3. Using the test card of the GN analyzer VITEC 2, strains were referred to *C. testosteroni*.
4. Using mass spectrometry, all strains were identified as *C. kerstersii* with a score of 2.19–2.33.

It should be taken into account that the *C. kerstersii* bacteria cannot be identified by the tests included in the NEFERM test24 kit and the GN VITEC 2 card, since only the *C. testosteroni* is represented in the databases of both methods. The taxonomic base of mass spectrometry includes reference spectra of five species of *Comamonas* from 21 known ones, including *C. kerstersii*.

Minimal inhibition concentration (MIC) of antibiotics of different groups of *C. kerstersii* strains is given in the table. The MIC of ceftazidime ranged from 0.75 to 2 mg/l; cefotaxime — from 0.75 to 4 mg/l; cefepime — from 0.25 to 1.5 mg/l; imipenem and meropenem — from 0.125 to 0.19 mg/l; ciprofloxacin — from 0.06 to > 32 mg/l; tetracycline — from 4 to 128 mg/l; chloramphenicol — from 1 to 3 mg/l, trimethoprim/sulfamethoxazole — from 0.25 to > 32 mg/l. MIC of gentamicin for all strains was 2 mg/l, of amikacin — 3–4 mg/l. Two strains of *C. kerstersii* isolated from residents of Saint Petersburg (No. 8 and 9 in the table), according to the CLSI criteria, were susceptible to all tested antibiotics.

Strains isolated from the residents of the Republic of Guinea were unsusceptible to at least one tested antibiotic: ciprofloxacin (4 strains), tetracycline

(5 strains) and trimethoprim/sulfamethoxazole (5 strains), almost all strains were simultaneously unsusceptible to several antibiotics: ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole (2 strains), tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole (2 strains), ciprofloxacin and tetracycline (1 strain). One strain was unsusceptible to ciprofloxacin, tetracycline, and trimethoprim/sulfamethoxazole.

Discussion

Microorganisms of the *Comamonas* genus are most often isolated from various environmental objects, such as wetland, humus, open water, contents of the termites intestine, less often from humans. For a long time, bacteria of this genus have not been considered pathogenic to humans, however, in recent years, reports of the isolation of *C. kerstersii* and *C. testosteroni* from patients with invasive infections have appeared, and the publications on etiological significance of *C. testosteroni* are more numerous [6, 7, 12, 13, 16, 20, 21].

C. kerstersii strains were isolated from patients with catheter-associated infections (bacteremia), peritonitis, appendicitis, postoperative complications in the form of septic infections, meningitis, etc. In Argentina in 2010–2015 *C. kerstersii* in association with other opportunistic microorganisms were isolated from the psoas abscess, and in a case of pelvic peritonitis, from the abdominal fluid in 12 patients with acute peritonitis that developed as a result of gangrenous or perforated appendicitis [4, 5]. In the UK for two years, *C. kerstersii* were isolated from 27 hospitalized patients with diarrhea. The authors suggested that the carriage of this microorganism in the intestine can occur more often than was previously thought, since modern identification methods were not available [8].

Identification of bacteria of the *Comamonas* genus presents significant difficulties. This is due to the relatively recent definition of them in a separate ge-

nus, the isolation of these bacteria almost always in the microbial associations as well as the difficulties of their differentiation from other *Pseudomonas* species. Until recently, the identification of strains was based on the study of biochemical activity, for correct identification it was necessary to study at least 11 substrates. Test systems and microbiological analyzers used in laboratory practice do not always allow to identify these hard-to-identify bacteria and to differentiate *C. kerstersii* species from *C. testosteroni*, since only one species, *C. testosteroni*, is included in the databases of many methods.

As the databases expand, the identification capacity of the methods will include a wider range of microorganisms, and other types of *Comamonas*. Publications about etiological significance of *C. kerstersii* appeared shortly after the method of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used to identify microorganisms in bacteriological laboratories and the reliability of the identification results was confirmed by molecular genetic methods [4, 5, 8, 17].

In connection with the foregoing, many authors believe that the etiological role of *C. kerstersii* is currently underestimated, since in the previously described cases of infections associated with isolation of microorganisms of the *Comamonadaceae* family, the identification of strains was carried out by methods that do not allow to differentiate species within the genus.

In 2015–2017 in the intestinal microbiota of 1532 people without signs of acute intestinal pathology living in Saint Petersburg, the strains of *C. kerstersii* were isolated in two patients, while in a survey of 46

residents of the Republic of Guinea this microorganism was detected in 8 individuals. Perhaps the frequent discovery of *C. kerstersii* is associated with the climatic and socio-economic conditions of the Republic of Guinea [19].

The antimicrobial susceptibility testing of *C. kerstersii* as causative agents of septic infections is complicated by the lack of data on the natural resistance of these microorganisms and the criteria for interpreting test results in the Russian Clinical Guidelines “Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms” and in the Guidelines of the European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) [2, 11]. The only guideline that presents the interpretation criteria that can be used for testing of *C. kerstersii* is the document CLSI M100-S27 [9].

The data of a few foreign studies of the antimicrobial susceptibility testing of *C. kerstersii* strains do not allow comparison of the results, as some authors used a disc-diffusion method (not recommended by CLSI) for testing these microorganisms [8] or testing using other interpretation criteria [4, 5]. Nevertheless, the MIC results allow us to conclude that resistance to fluoroquinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole and amikacin was noted among *C. kerstersii* strains isolated at different times [4, 5, 17]. Our results confirm the high in vitro activity of the expanded spectrum cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides and chloramphenicol against *C. kerstersii* strains. Unsusceptible (to ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracycline) *C. kerstersii* strains were isolated only from the residents of the Republic of Guinea.

Список литературы/References

1. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника: федеральные клинические рекомендации. М., 2015: 36. [Opredelenie disbioticheskikh izmenenii zheludochno-kishechnogo trakta po markeram sodержimogo kishechnika: federal'nye klinicheskie rekomendatsii [Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents: federal clinical recommendations]. Moscow, 2015. 36 p.
2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. Версия 2015-02 [Determination of sensitivity to antimicrobials: clinical recommendations. Version 2015-02]. URL: <http://www.antibiotic.ru/min-zdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf> (12.11.2017).
3. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: отраслевой стандарт. (ОСТ 91500.11.0004). Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003 [Protocol of management of patients. Dysbacteriosis of the intestine: industry standard. (OST 91500.11.0004). Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 231 of 09.06.2003]. URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=62571> (12.11.2017).
4. Almuzara M., Barberis C., Veiga F., Bakai R., Cittadini R., Ocampo C.V., Serena M.A., Cohen E., Ramirez M.S., Famiglietti A., Stecher D., del Castillo M., Vay C. Unusual presentations of *Comamonas kerstersii* infection. *New Microbes New Infect.*, 2017, vol. 19, pp. 91–95.
5. Almuzara M.N., Cittadini R., Ocampo C.V., Bakai R., Traglia G., Ramirez M.S. Intra-abdominal infections due to *Comamonas kerstersii*. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, pp. 1998–2000.
6. Arda B., Aydemir S., Yamazhan T., Hassan A., Tünger A., Serter D. *Comamonas testosteroni* meningitis in a patient with recurrent cholesteatoma. *APMIS*, 2003, vol. 111, pp. 474–476.
7. Barbaro D.J., Mackowiak P.A., Barth S.S., Southern P.M. Jr. *Pseudomonas testosteroni* infections: eighteen recent cases and a review of the literature. *Rev. Infect. Dis.*, 1987, vol. 9, pp. 124–129.
8. Biswas J., Fitchett J., O'Hara G. *Comamonas kerstersii* and the perforated appendix. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 31–34.
9. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017. 224 p.
10. De Vos P., Kersters K., Falsen E., Pot B., Gillis M., Segers P., De Ley J. *Comamonas Davis and Park 1962* gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, vol. 35, pp. 443–453. doi: 10.1099/00207713-35-4-443

11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, valid from 2017-03-10. URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf (12.11.2017).
12. Farshad S., Norouzi F., Aminshahidi M., Heidari B., Alborzi A. Two cases of bacteremia due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni*, in Iran and a review literature. *J. Infect. Develop. Countries.*, 2012, vol. 6, pp. 521–525.
13. Gul M., Ciragil P., Bulbuloglu E., Aral M., Alkis S., Ezberci F. *Comamonas testosteroni* bacteremia in a patient with perforated acute appendicitis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2007, vol. 54, pp. 317–321.
14. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. URL: <http://www.bacterio.net/comamonas.html> (12.11.2017).
15. Nakipoglu Y., Buyukbaba-Boral O., Aksozek A., Aydin S., Derbentli S. Evaluation of the contaminant organisms of humidifier reservoir water and investigation of the source of contamination in a university hospital in Turkey. *Am. J. Infect. Control.*, 2005, vol. 33, pp. 62–63.
16. Nseir W., Khateeb J., Awawdeh M., Ghali M. Catheter-related bacteremia caused by *Comamonas testosteroni* in a hemodialysis patient. *Hemodial. Int.*, 2011, vol. 15, pp. 293–296.
17. Opota O., Ney B., Zanetti G., Jatou K., Greub G., Prod'homme G. Bacteremia caused by *Comamonas kerstersii* in a patient with diverticulosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, pp. 1009–1012.
18. Palleroni N.J., Kinsawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *J. Syst. Bacteriol.*, 1973, vol. 23, pp. 333–339.
19. Popova A.Yu., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Voitenkova E.V., Zabrovskaya A.V., Egorova S.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Zueva E.V., Porin A.A., Buaro M.Y., Konstantinov O.K., Totolian A.A. Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 375–382. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382.
20. Reddy A.K., Murthy S.I., Jalali S., Gopinathan U. Post-operative endophthalmitis due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni*. *J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 58, pp. 374–375.
21. Tsui T.L., Tsao S.M., Liu K.S., Chen T.Y., Wang Y.L., Teng Y.H., Lee Y.T. *Comamonas testosteroni* infection in Taiwan: reported two cases and literature review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2011, vol. 44, pp. 67–71.
22. Wauters G., De Baere T., Willems A., Falsen E., Vanechoutte M. Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, vol. 53, pp. 859–862.

Авторы:

Войтенкова Е.В., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Матвеева З.Н., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Макарова М.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Егорова С.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Забровская А.В., к.в.н., старший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Сужаева Л.В., младший научный сотрудник лаборатории кишечных инфекций 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;
Кафтырева Л.А., д.м.н., профессор, зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Voitenkova E.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Matveeva Z.N., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Makarova M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Egorova S.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Zabrovskaya A.V., PhD (Veterinary), Senior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Suzhaeva L.V., Junior Researcher, Laboratory of Enteric Infections, 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;
Kaftyreva L.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ПОПУЛЯЦИЕЙ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК DCreg

Э.И. Рубакова, М.А. Капина, Н.Н. Логунова, К.Б. Майоров, А.С. Апт

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. При высоком уровне генетически обусловленной чувствительности к туберкулезу (ТБ) гранулематозные реакции в ткани легкого не справляются с задачей по изолированию очага инфекции и приводят к диффузным поражениям легочной ткани, слиянию гранулем и образованию некротических очагов. Неконтролируемое воспаление наносит тяжелый урон дыхательной функции легкого, поэтому для контроля инфекции необходим баланс между защитными и патогенетическими реакциями иммунного ответа. Важными клеточными регуляторами воспаления являются незрелые регуляторные дендритные клетки (DCreg) и регуляторные Т-лимфоциты (Treg). Ранее мы показали, что клетки стромы легкого в культуре *in vitro* поддерживают развитие DCreg с фенотипом CD11b⁺CD11c^{low}CD103⁻ из предшественников, выделенных из костного мозга. Было также установлено, что между чувствительными и резистентными к ТБ мышами имеются заметные различия по размерам и динамическим характеристикам популяции регуляторных Т-клеток CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) в легких: их количество у более резистентных мышей линии В6 достоверно выше, чем у чувствительных мышей линии I/St. В настоящей работе было установлено, что адоптивный перенос DCreg зараженным ТБ мышам генетически чувствительной линии I/St способен индуцировать увеличение популяции Treg в ткани легкого. Увеличение пула Treg приводит к ослаблению туберкулезной легочной патологии, замедлению размножения микобактерий в органе и снижению инфильтрации ткани легкого нейтрофилами, то есть к избирательному снижению количества именно тех иммунных клеток, которые считаются основным фактором патогенеза при ТБ генетически чувствительных животных. Основным отличием в характере легочной патологии было отсутствие у реципиентов DCreg очагов деструкции легочной ткани и зон некроза, которые обнаруживались в контрольной группе. При этом мыши всех групп не отличались по уровню продукции регуляторных (IL-10 и TGF-β) и ключевых воспалительных (IFNγ и IL-6) цитокинов клетками легкого. Этот результат дает основания полагать, что умеренное снижение тяжести туберкулезного процесса в группе мышей с повышенным содержанием Treg в легких может быть связано с подавлением воспаления не через секреторные, а через контактные механизмы, множество которых широко используют регуляторные клетки. Хотя терапевтический эффект переноса клеток был умеренным, наши результаты можно рассматривать как доказательство действенности клеточной терапии для регуляции воспаления легочной ткани при ТБ.

Ключевые слова: DCreg, Treg, туберкулез, экспериментальная модель, патология легких.

REGULATION OF IMMUNE RESPONSE AGAINST *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BY THE POPULATION OF REGULATORY DENDRITIC CELLS

Rubakova E.I., Kapina M.A., Logunova N.N., Majorov K.B., Apt A.S.

Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation

Abstract. On the background of a high level of genetic susceptibility to tuberculosis infection (TB), granulomatous reactions in the lung tissue fail to effectively isolate infection foci and rather result in diffuse pathology, confluence of granulomata and

Адрес для переписки:

Апт Александр Соломонович
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2, ФГБУ «ЦНИИТ».
Тел.: 8 (499) 785-90-72 (служебн.).
E-mail: alexapt0151@gmail.com

Contacts:

Alexander S. Apt
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya alley, 2,
Central Research Institute of Tuberculosis.
Phone: +7 (812) 785-90-72 (office).
E-mail: alexapt0151@gmail.com

Библиографическое описание:

Рубакова Э.И., Капина М.А., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С. Регуляция иммунного ответа против *Mycobacterium tuberculosis* популяцией регуляторных дендритных клеток // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 169–175. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-169-174

Citation:

Rubakova E.I., Kapina M.A., Logunova N.N., Majorov K.B., Apt A.S. Regulation of immune response against *Mycobacterium tuberculosis* by the population of regulatory dendritic cells // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 169–175. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-169-174

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-45-04015).

formation of necrotic zones. Uncontrolled inflammation severely affect breathing function of the lung. Thus, effective disease control requires a good balance between protective and pathogenic immune responses. Immature regulatory dendritic cells (DCreg) and regulatory T lymphocytes (Treg) represent a pool of important cellular regulators of inflammation. Earlier we have demonstrated that stromal lung cells support development of CD11b⁺CD11c^{low}CD103⁻ DCreg from their bone marrow-derived precursors in *in vitro* cultures. In addition, significantly larger population size and more rapid development of the lung CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells characterize TB-resistant B6 mice compare to their TB-susceptible I/St counterparts. Here, we report that adoptive transfer of DCreg cells into TB-infected I/St mice is capable to enlarge the population of Treg cells in the lungs. This, in turn, attenuates lung pathology, decreases mycobacterial multiplication and diminishes lung infiltration with neutrophils, i.e., selectively restricts the population of cell largely responsible for TB pathogenesis. The key difference in lung pathology between DCreg recipients and control animals was the lack of tissue-destructive foci and necrotic zones in the former group. Meanwhile, the groups of mice did not differ in production of regulatory (IL-10 and TGF- β) and key inflammatory (IFN γ and IL-6) cytokines by lung cells. The latter result suggests that contact rather than secretory mechanisms underlie moderate attenuation of the TB process in the lungs of mice with an elevated lung Treg level, given that plethora of such mechanisms were described for Treg functioning. Although therapeutic effects were relatively weak, our results indicate that cell therapy approaches are applicable to regulation of lung tissue inflammation during TB course.

Key words: DCreg, Treg, tuberculosis, experimental model, lung pathology.

Введение

Дендритные клетки (ДК) не только являются самым мощным фактором индукции адаптивного иммунного ответа, но и способны вызывать и поддерживать иммунологическую толерантность, особенно на ранних стадиях своей дифференцировки [24]. Способность незрелых ДК подавлять иммунный ответ реализуется через разные механизмы, в том числе продукцию подавляющих ответ цитокинов, индукцию анергии и активацию регуляторных Т-клеток [12, 13]. Подобная многослойная система подавления иммунитета принципиально важна не только для ингибирования аутоиммунных реакций и подавления потенциально опасного ответа на нормальную флору кишечника и легких, но и для контроля избыточного, повреждающего ткани воспаления при ответе на патогенные микроорганизмы [23]. Особенно важен баланс между активацией и подавлением иммунного ответа при пролонгированных, хронических инфекциях, при которых ограничение размножения и диссеминации патогена за счет воспаления, повреждающего ткани и нарушающего функционирование органа, может оказаться чрезмерной платой. В полной мере это относится к такому хроническому инфекционному заболеванию, как туберкулез (ТБ) легких [2, 25].

Клетки иммунной системы, быстро мигрирующие к первичному очагу ТБ в легочной ткани, в течение первых недель инфекции формируют специфические гранулемы, функция которых, в первую очередь, состоит в ограничении зоны заражения и создании неблагоприятных для внутриклеточного размножения микобактерий анаэробных условий. Однако при высоком уровне генетически обусловленной чувствительности к инфекции и у человека, и у мыши гранулематозные реакции не справляются с задачей по изолированию очага инфекции и часто сочетаются с диффузным поражением легочной ткани, прогрессирующим

ростом самих гранулем, их слиянием и образованием некротических очагов, окруженных зоной гипоксии [8, 17, 26]. Такое неконтролируемое воспаление наносит тяжелый урон дыхательной функции легкого, поэтому поддержание баланса между защитными и патогенетическими реакциями иммунного ответа, при том что оба типа реакций зависят от клеточного иммунитета, чрезвычайно важно для успешного контролирования не столько популяции *M. tuberculosis*, сколько тяжести течения самого заболевания, вызванного этим патогеном [18].

На протяжении многих лет индукция в легочной ткани Т-клеточного иммунного ответа по типу 1, то есть продукция Т-клетками CD4⁺ интерферона- γ (IFN γ), активирующего уничтожение *M. tuberculosis* в зараженных макрофагах, считалась основным защитным механизмом противотуберкулезного ответа [6, 14]. Однако совсем недавно появились данные, подвергшие серьезным сомнениям защитное значение этого типа ответа в легких [21], что вызывает резонные вопросы о потенциальном патогенном влиянии IFN γ как очень токсичного, повреждающего ткани цитокина. Сходным образом еще один основной провоспалительный цитокин, TNF α , важен для поддержания целостности легочных гранулем [19], но при избыточной выработке повреждает легочную ткань [1]. Многие другие воспалительные цитокины, такие как IL-1, IL-6 и IL-11, при ТБ продуцируются в значительных количествах, и для каждого показана скорее патогенная, чем защитная роль [3, 22]. Совокупность этих данных убедительно свидетельствует о важности включения противовоспалительных механизмов в пораженном ТБ легком.

В наших предыдущих исследованиях было показано, что клетки стромы легкого в культуре *in vitro* поддерживают развитие незрелых регуляторных ДК (DCreg) с фенотипом CD11b⁺CD11c^{low}CD103⁻ из предшественников, выделенных из костного мозга. Кроме того, мы

охарактеризовали различия между мышами с генетически низкой и высокой восприимчивостью к туберкулезу по активности подавления иммунного ответа на микобактерии, обусловленного растворимыми факторами PGE₂, NO и IL-10, продуцируемыми DCreg [7]. Было также установлено, что между чувствительными и резистентными к ТБ мышами имеются заметные различия по размерам и динамическим характеристикам популяции регуляторных Т-клеток CD4⁺Foxp3⁺ (Treg) в легких: их количество у более резистентных мышей линии B6 достоверно выше, чем у чувствительных мышей линии I/St. Поскольку у мышей I/St инфекция сопровождается неконтролируемым воспалением легочной ткани и тяжелой инфильтрацией легких нейтрофилами [5, 11, 28], можно было предположить, что недостаток клеток Treg мешает контролировать воспаление, что приводит к неблагоприятному течению инфекции. Поэтому в настоящей работе мы попытались ответить на вопрос о способности DCreg индуцировать популяцию Treg *in vivo*, а также охарактеризовать параметры противотуберкулезного иммунитета у генетически чувствительных к ТБ реципиентов после адоптивного переноса DCreg.

Материалы и методы

Мыши. В работе были использованы инбредные мыши линии I/StYCit (I/St) в возрасте 2,5 месяцев к началу всех типов экспериментов. Линия поддерживается в питомнике ФГБНУ «ЦНИИТ» в обычных условиях, с доступом к корму и воде *ad libitum*. Все экспериментальные процедуры были одобрены институтским Комитетом по правильному обращению с лабораторными животными (IACUC, протоколы № 2, 7, 8, 11, 13 одобрены 6 марта 2015 г.).

Получение клеток стромы легких и регуляторных дендритных клеток. Подробные протоколы для получения клеток описаны ранее [7]. Кратко: суспензию клеток легкого получали стандартным способом [4, 5], а затем для очистки клеток стромы 20–30 × 10⁶ клеток легкого инкубировали в 10 мл среды RPMI-1640 со стандартными добавками (HiClone, Carlington, Нидерланды) в течение 2-х ч на 90-мм чашках Петри (Costar-Corning, Vadhoevedorp, Нидерланды) при 37°C. Неприлипшие клетки смывали трехкратно теплым HBSS, прилипшие клетки снимали с пластика после инкубации в растворе 0,02% EDTA-PBS в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для получения предшественников ДК из клеток костного мозга от 12–16 мышей в каждом эксперименте изолировали клетки BMLin⁻ с помощью набора «Cell lineage depletion kit (Milteneiy Biotech, Gladbach, Германия)», следуя протоколам изготовителя. Кратко: костномозговые клетки обрабатывали биотинилированными антителами к поверхностным маркерам CD11b,

CD5, CD45R, Gr-1 (Ly6C + Ly6G), 7-4 и TER-119, а затем инкубировали антибиотиновыми магнитными шариками при 4°C 15 мин в PBS, содержащем 0,5% BSA и 2mM EDTA. После отмывки клетки BMLin⁺ убрали на разделительных колонках MidiMACS, а полученные клетки lin⁻ (~2% от исходной суспензии) помещали в совместную культуру со стромальными клетками легкого в соотношении 5:1 на 7 сут.

Заражение и параметры инфекции. Животных заражали *M. tuberculosis* H37Rv (Pasteur) в дозе 500–600 КОЕ на мышью в аэрозольной камере (Glas-Col, США), как подробно описано ранее [17]. Для определения количества микобактерий в органах стерильно выделяли легкие и селезенки, гомогенизировали в 2 мл физиологического раствора, готовили серийные десятикратные разведения гомогенатов органов и высевали на чашки Петри с агаром Дюбо (Difco, США), по 50 мкл на чашку. Подсчитывали количество колоний через 21 день инкубации при 37°C.

Введение клеток. После 7 дней культивирования на строме легкого размножившиеся DCreg снимали энергичным пипетированием, отмывали 2 раза в HBSS, переводили в PBS и вводили внутривенно в дозе 10⁶ на мышью животным, зараженным за 3 недели до введения клеток. Еще через 2 недели проводили оценку параметров иммунного ответа и воспаления. Следует отметить, что, в отличие от переноса свежих лимфоидных клеток полученных *ex vivo*, внутривенное введение культивированных *in vitro* крупных адгезивных клеток часто вызывает эмболии и гибель реципиентов «на игле». Поэтому нам пришлось ограничиться однократным введением клеток, так что наши эксперименты можно, скорее, рассматривать как доказательство действенности данного подхода к регуляции воспаления, а не полноценную клеточную терапию.

Приготовление суспензии легких и проточная цитофлуориметрия. Клеточную суспензию из легких индивидуальных мышей готовили как описано ранее [4]. 1–2 × 10⁶ клеток легких инкубировали 5 мин при 4°C с моноклональными антителами анти-CD16/CD32 (clone CT-17.1.17.2) для блокирования Fc-рецепторов, после чего окрашивали моноклональными антителами, меченными либо PE, либо FITC к следующим маркерам: CD4, CD8, CD19, F4/80, Ly-6G (клон 1A8), CD44 и CD62L (BD Biosciences). Окрашенные клетки отмывали дважды и фиксировали в 1% параформальдегиде, после чего анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Внутриклеточная окраска транскрипционного фактора FoxP3 регуляторных клеток Treg проводилась с помощью набора компании eBioscience (США) согласно рекомендациям производителя.

Гистологические исследования. Для исследования патологических изменений в легких ткань замораживали в режиме температурного градиента от –60 до –20°C в течение 1 ч в электронном

Таблица 1. Количество лимфоидных клеток* в легких зараженных мышей трех сравниваемых групп**

Table 1. Lymphoid cell content in the lungs of infected mice of the three experimental groups

Перенос клеток Transferred cells	CD4	CD8	CD19	CD44 ⁺ CD62L ⁻	CD44 ⁻ CD62L ⁺	CD11b ⁺	F4/80
DCreg	59±4,1	38±4,5	7,0±0,6	68±1,8	8±0,8	13±0,7	65±5,0
CD11b	51±4,0	44±4,4	4,0±0,9	69±1,2	8±0,8	9±0,5	55±3,3
–	59±3,3	39±3,1	6±1,0	67±2,3	10±1,6	14±0,9	56±3,5

* × 10⁶ на орган±SEM, N = 4–7. ** Нет достоверных отличий между группами.* × 10⁶ per organ±SEM, N = 4–7. ** No significant differences between experimental groups.

криотоме (ThermoShandon, Великобритания). Получали срезы толщиной 7 мкм. Срезы высушивали на воздухе, фиксировали в метаноле и окрашивали гематоксилином и эозином.

Определение продукции цитокинов проводили иммуноферментным методом с помощью наборов ELISA для цитокинов мыши (R&D Systems, США) согласно протоколам изготовителя. Клетки легкого культивировали в течение 48 ч и затем определяли содержимое цитокинов (табл. 2) в культуральной жидкости.

Результаты и обсуждение

После заражения мышей микобактериями через респираторный тракт аэрогенным способом адаптивный иммунный ответ на инфекцию и образование туберкулезных гранулем с участием Т-лимфоцитов начинается через две недели после заражения и достигает полного развития через 3–4 недели [4]. Поэтому мы предприняли попытку стимулировать увеличение популяции клеток Treg в легочной ткани именно на этот срок. Через 3 недели после заражения мышам внутривенно вводили 10⁶ DCreg и через 2 недели после введения оценивали параметры клеточного состава легких и иммунного ответа в подопытной и контрольных группах реципиентов. В качестве контроля служили не только животные, которым не вводили никаких клеток, но и мыши, которым ввели 10⁶ высокоочищенных клеток CD11b⁺, выделенных из костного мозга.

Как показано на рисунке 1А (II обложка), у реципиентов DCreg размер популяции Treg в легких оказался достоверно больше по сравнению с реципиентами костномозговых клеток CD11b⁺ и животными, не получившими клеток (8,2±3,0 × 10⁶,

5,0±0,5 × 10⁶ и 3,5±1,6 × 10⁶ соответственно, p < 0,05, ANOVA). Таким образом, введение экзогенных регуляторных ДК действительно приводит к увеличению пула клеток Treg в органе, где развивается туберкулезная патология. Чтобы проверить, как сказывается присутствие в легочной ткани большего количества Treg на течение инфекции, были исследованы основные характеристики туберкулезного процесса — инфильтрация ткани легкого клетками иммунной системы, размножение в легких микобактерий и характер легочной патологии.

Количественная характеристика присутствующих в легких клеток иммунной системы имеет прямое отношение к патогенезу ТБ и традиционно входит в ряд исследуемых при инфекции фенотипов [2, 3, 18]. Поэтому мы оценили размер всех основных популяций иммуноцитов в легких зараженных мышей: Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺, В-лимфоцитов CD19⁺, макрофагов F4/80⁺ и нейтрофилов Ly-6G⁺, а также долю активированных клеток с фенотипом CD44⁺CD62L⁻. Размеры популяций лимфоцитов и макрофагов, а также степень их активации в трех группах мышей оказались одинаковыми (табл. 1), но один важный параметр клеточной инфильтрации пораженной инфекцией легочной ткани выбивался из этого ряда. Как показано на рисунке 1Б (II обложка), у реципиентов DCreg в легких обнаруживалось достоверно меньше нейтрофилов по сравнению с контролем, не получавшим клеток (p = 0,03, ANOVA), то есть избирательно снижалось количество именно тех иммуноцитов, которые считаются основным фактором патогенеза при ТБ генетически чувствительных животных [5, 28]. Правда к этому результату следует относиться с осторожностью, поскольку после введения костномозговых клеток CD11b⁺ также наблюдалось достовер-

Таблица 2. Продукция основных воспалительных (IFN γ , IL-6) и противовоспалительных (TGF- β , IL-10) цитокинов* клетками легкого зараженных мышей в культуре**Table 2. Production of the key pro-inflammatory (IFN γ , IL-6) and anti-inflammatory (TGF- β , IL-10) cytokines* by the lung cells from infected mice in culture**

Перенос клеток Transferred cells	Цитокин/Cytokine			
	IFN γ	IL-6	TGF- β	IL-10
DCreg	1224±414	4843±521	177±12,6	1725±264
CD11b	1912±515	6432±725	210±12,2	2820±524
–	2301±659	5773±380	189±8,7	2767±643

* пг/мл±SEM, N = 4–7. ** Нет достоверных отличий между группами.

* pg/ml±SEM, N = 4–7. ** No significant differences between experimental groups.

ное снижение инфильтрации легких нейтрофилами (рис. 1Б). Поскольку в немногочисленных работах по исследованию индукции Treg введением DCreg и влиянию этих регуляторных клеток на течение инфекций [9, 15] никогда не использовался подобный контроль, мы пока не можем оценить универсальность данного феномена и дать ему достаточно весомое объяснение. Следует, тем не менее, подчеркнуть, что данный результат вряд ли является артефактом, поскольку подтверждается анализом патологических изменений в легких (см. ниже). Кроме того, оказалось, что в группе мышей с повышенным содержанием Treg в легких достоверно снижалось размножение микобактерий в этом органе (рис. 1В, II обложка), тогда как количество микобактерий в селезенке было одинаковым у всех групп мышей (данные не приводятся).

Как показано на рисунке 2 (II обложка), у реципиентов DCreg и костномозговых клеток CD11b⁺ воспалительный процесс в легких протекал сходным образом и был менее выраженным по сравнению с контрольными животными. Основным отличием было отсутствие у реципиентов очагов деструкции легочной ткани и зон некроза, которые обнаруживались в контрольной группе.

Регуляторные Т-лимфоциты подавляют активность эффекторных клеток иммунного ответа и воспаления, используя множество механизмов, в числе которых одним из основных считается продукция противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β , снижающих уровень воспалительных факторов [20]. Для оценки соответствующих параметров в нашей тест-системе мы оценили продукцию противовоспалительных молекул IL-10 и TGF- β и ключевых воспалительных факторов IFN γ и IL-6 клетками легких, выделенными

ми из зараженных мышей трех групп и помещенными в культуру. Как показано в таблице 2, мыши всех трех групп не отличались по уровню продукции регуляторных цитокинов. Этот результат дает основания полагать, что умеренное снижение тяжести туберкулезного процесса в группе мышей с повышенным содержанием Treg в легких может быть связано с подавлением воспаления не через секреторные, а через контактные механизмы, множество которых широко используют регуляторные клетки [10, 16, 27].

Выводы

1. Клетки костного мозга из пула lin⁻ после дифференцировки и пролиферации в контакте с клетками стромы легкого приобретают не только фенотип регуляторных ДК [18], но и способность индуцировать *in vivo* увеличение в легочной ткани зараженных туберкулезом мышей популяции регуляторных клеток Treg.
2. Увеличение пула Treg в легких приводит к умеренному терапевтическому эффекту: снижению тяжести легочной патологии за счет замедления некротического поражения ткани и уменьшения притока нейтрофилов.
3. Ослабление воспалительных реакций сочетается с достоверным снижением скорости размножения микобактерий в легких.
4. Учитывая, что у реципиентов регуляторных ДК не меняется продукция про- и противовоспалительных цитокинов клетками легкого, можно предположить, что регуляция проходит на уровне клеточных контактов.

Список литературы/References

1. Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremond C., Yermeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B., Nedospasov S.A., Quesniaux V.F.J., Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of Mycobacterium tuberculosis infection. *Sci. Rep.*, 2013, vol. 3, no. 1809, 14 p. doi: 10.1038/srep01809
2. Cooper A.M. T cells in mycobacterial infection and disease. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009, vol. 21, iss. 4, pp. 378–384. doi: 10.1016/j.coi.2009.06.004
3. Dorhoi A., Reece S.T., Kaufmann S.H.E. For better or for worse: the immune response against Mycobacterium tuberculosis balances pathology and protection. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 240, iss. 1, pp. 235–251. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x
4. Eruslanov E.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Majorov K.B., Scheglov I.V., Orlova M.O., Apt A.S. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 3, pp. 1744–1753. doi: 10.1128/IAI.73.3.1744-1753.2005
5. Eruslanov E.B., Majorov K.B., Orlova M.O., Mischenko V.V., Kondratieva T.K., Apt A.S., Lyadova I.V. Lung cell responses to M. tuberculosis in genetically susceptible and resistant mice following intratracheal challenge. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 135, no. 1, pp. 19–28.
6. Flynn J.L., Chan J., Triebold K.J., Dalton D.K., Stewart T.A., Bloom B.R. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.*, 1993, vol. 176, no. 6, pp. 2249–2254.
7. Kapina M.A., Rubakova E.I., Majorov K.B., Logunova N.N., Apt A.S. Capacity of lung stroma to educate dendritic cells inhibiting mycobacteria-specific T-cell response depends upon genetic susceptibility to tuberculosis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 8: e72773. doi: 10.1371/journal.pone.0072773
8. Kondratieva E.V., Logunova N.N., Majorov K.B., Averbakh M.M., Apt A.S. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to M. tuberculosis and M. avium. *PLoS ONE*, 2010, vol. 6, no. 5: e10515. doi: 10.1371/journal.pone.0010515
9. Leepiyasakulchai C., Ignatowicz L., Pawlowski A., Källenius G., Sköld M. Failure to recruit anti-inflammatory CD103⁺ dendritic cells and a diminished CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell pool in mice that display excessive lung inflammation and increased susceptibility to Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.*, 2012, vol. 80, no. 3, pp. 1128–1139. doi: 10.1128/IAI.05552-11

10. Liang B., Workman C., Lee J., Chew C., Dale B.M., Colonna L., Flores M., Li N., Schweighoffer E., Greenberg S., Tybulewicz V., Vignali D., Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 9, pp. 5916–5926. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.5916
11. Logunova N.N., Korotetskaya M.V., Polshakov V.I., Apt A.S. The QTL within the H2 complex involved in the control of tuberculosis infection in mice is the classical class II H2-Ab1 gene. *PLoS Genet.*, 2015, vol. 11, no. 11: e1005672. doi: 10.1371/journal.pgen.1005672
12. Lutz M.B., Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.*, 2002, vol. 23, no. 9, pp. 445–449.
13. Maldonado R.A., von Andrian U.H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv. Immunol.*, 2010, vol. 108, pp. 111–165. doi: 10.1016/B978-0-12-380995-7.00004-5
14. O'Garra A., Redford P.S., McNab F.W., Bloom C.I., Wilkinson R.J., Berry M.P. The immune response in tuberculosis. *Ann. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 31, pp. 475–527. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939
15. Owens B.M., Kaye P.M. Stromal cell induction of regulatory dendritic cells. *Front. Immunol.*, 2012, vol. 3, 6 p. doi: 10.3389/fimmu.2012.00262
16. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S.K., Sansom D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 2011, vol. 332, iss. 6029, pp. 600–603. doi: 10.1126/science.1202947
17. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A.S. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2008, vol. 88, iss. 6, pp. 576–585. doi: 10.1016/j.tube.2008.05.003
18. Reece S.T., Kaufmann S.H.E. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? *Curr. Opin. Microbiol.*, 2012, vol. 15, iss. 1, pp. 63–70. doi: 10.1016/j.mib.2011.10.006
19. Rook G.A.W., Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1996, vol. 50, pp. 259–284. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.259
20. Sakaguchi S., Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 10, pp. 1105–1111. doi: 10.1093/intimm/dxp095
21. Sakai S., Kauffman K.D., Sallin M.A., Sharpe A.H., Young H.A., Ganusov V.V., Barber D.L. CD4 T cell-derived IFN γ plays a minimal role in control of pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection and must be actively repressed by PD-1 to prevent lethal disease. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 5: e1005667. doi: 10.1371/journal.ppat.1005667
22. Shepelkova G., Evstifeev V., Majorov K., Bocharova I., Apt A. Therapeutic effect of recombinant mutated interleukin 11 in the mouse model of tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 2016, vol. 214, iss. 3, pp. 496–501. doi: 10.1093/infdis/jiw176
23. Smits H.H., de Jong E.C., Wierenga E.A., Kapsenberg M.L. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.*, 2005, vol. 26, no. 3, pp. 123–129. doi: 10.1016/j.it.2005.01.002
24. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, vol. 21, pp. 685–711. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040
25. Torrado E., Robinson R.T., Cooper A.M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol.*, 2011, vol. 32, no. 2, pp. 66–72. doi: 10.1016/j.it.2010.12.001
26. Tsai M.C., Chakravarty S., Zhu G., Xu J., Tanaka K., Tufariello J., Flynn J., Chan J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.*, 2006, vol. 8, no. 2, pp. 218–232. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x
27. Wang J., Lu Z.H., Gabius H.J., Rohowsky-Kochan C., Ledeen R.W., Wu G. Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182, no. 7, pp. 4036–4045. doi: 10.4049/jimmunol.0802981
28. Yeremeev V.V., Linge I.A., Kondratieva T.K., Apt A.S. Neutrophils exacerbate tuberculosis infection in genetically susceptible mice. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2015, vol. 95, no. 4, pp. 447–451. doi: 10.1016/j.tube.2015.03.007

Авторы:

Рубакова Э.И., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Капина М.А., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Логунова Н.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Майоров К.Б., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Апт А.С., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией иммуногенетики ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Rubakova E.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Kapina M.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Logunova N.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Maierov K.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunogenetics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Apt A.S., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunogenetics, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.07.2017
Отправлена на доработку 27.02.2018
Принята к печати 16.05.2018

Received 16.07.2017
Revision received 27.02.2018
Accepted 16.05.2018

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ СВОЙСТВО СКОРОСТИ РОСТА КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *Mycobacterium tuberculosis*: ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ, ЛОКАЛИЗАЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА, ЛЕЧЕНИЯ

О.А. Маничева¹, М.З. Догондзе¹, Н.Н. Мельникова¹, Б.И. Вишневский¹, С.А. Маничев²

¹ ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Фенотипические свойства штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным или внелегочным туберкулезом, определяются комплексом факторов: генетическими особенностями патогена, его способностью к адаптации *in vivo* и *in vitro*, воздействием иммунной системы хозяина, влиянием химиотерапии. Наиболее доступным для исследования взаимоотношений хозяин-патоген на уровне «макроорганизм/штаммовая популяция» является фенотипическое свойство — скорость роста. Темп репликации, как правило, исследуют в сопоставлении с лекарственной чувствительностью микобактерий или с их генотипическими особенностями. Целью работы была оценка *in vitro* скорости роста штаммов *M. tuberculosis*, выделенных из диагностического материала больных туберкулезом при легочной и внелегочной локализации, нелеченых и леченых (оперированных и неоперированных), а также чувствительных и устойчивых изолятов в сравнении с референтным штаммом H37Rv. Для оценки скорости роста 116 клинических изолятов использовали модификацию метода, предложенного A. von Groll et al.: для построения кривой роста измеряли интенсивность флуоресценции в 96-луночном планшете (с помощью индикатора резазурина) ежедневно в течение 8 дней. Скорость роста определяли как наклон полученной кривой. Вычисляли средние значения в группах: 1 — нелеченые больные туберкулезом органов дыхания (ТОД), респираторный материал; 2 — леченые неоперированные больные ТОД, респираторный материал; 3 группа — леченые оперированные больные ТОД (преимущественно с хроническим и гиперхроническим течением процесса), респираторный материал; 4 — аналогичные пациенты, операционный материал; 5 — больные костно-суставным туберкулезом (КСТ), операционный материал. Кроме того, исследовали группы чувствительных и резистентных штаммов, между которыми значимых различий в скорости роста не обнаружили. Параметры роста штаммов, выделенных из материала больных ТОД, превышали таковые при КСТ. Это объясняется менее благоприятными условиями вегетации возбудителя при КСТ. Поскольку при локализации туберкулезного поражения, отграниченного

Адрес для переписки:

Маничева Ольга Алексеевна
194064, Россия, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 32,
ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ.
Тел.: 8 (812) 297-86-31 (служебн.).
Факс: 8 (812) 297-16-26.
E-mail: olgamanicheva@rambler.ru

Contacts:

Olga A. Manicheva
194064, Russian Federation, St. Petersburg, Polytechnicheskaya str., 32,
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology.
Phone: +7 (812) 297-86-31 (office).
Fax: +7 (812) 297-16-26.
E-mail: olgamanicheva@rambler.ru

Библиографическое описание:

Маничева О.А., Догондзе М.З., Мельникова Н.Н., Вишневский Б.И., Маничев С.А. Фенотипическое свойство скорости роста клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*: зависимость от локализации процесса, лечения, лекарственной чувствительности // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 175–186. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-175-186

Citation:

Manicheva O.A., Dogonadze M.Z., Melnikova N.N., Vishnevskiy B.I., Manichev S.A. The growth rate phenotypic property of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains: dependence on tuberculosis localization, treatment, drug susceptibility // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 175–186. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-175-186

от внешней среды, невозможна передача возбудителя к другому хозяину, то невозможна и селекция штаммов по способности выживать в тканях костно-суставной системы, следовательно, в этом случае следует говорить об адаптации штаммовой популяции патогена к индивидуальному хозяину. Скорость роста изолятов от не-леченых пациентов с ТОД была выше, чем у леченых. Сравнение параметров роста только МЛУ штаммов 1–5 групп для устранения влияния фактора чувствительности/устойчивости в целом выявило ту же картину. Снижение скорости роста штаммов, выделенных от леченых пациентов с ТОД, мы считаем результатом не только лечения, но и адаптации патогена к его окружающей среде — внутренней среде макроорганизма. Для подтверждения этого предположения оценили бактериальную нагрузку 1083 образцов диагностического материала, сгруппированных аналогичным образом, при этом отбирали только МЛУ/ШЛУ штаммы. В группах леченых больных частота высокой обсемененности ($\text{КОЕ} \geq 100$) достигала 52,5–63,8%, что свидетельствует о сохранении жизнеспособности возбудителя у таких пациентов. Скорость роста не адаптированного (вследствие длительных пассажей на искусственных средах) к макроорганизму штамма H37Rv по средним значениям была значимо выше, чем во всех группах клинических штаммов. Таким образом, выявлена гетерогенность фенотипических свойств клинических штаммов *M. tuberculosis* по признаку скорости роста. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* зависит от локализации процесса (ТОД, КСТ) и совместного воздействия факторов лечения пациентов и адаптации патогена к хозяину.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, клинические штаммы, скорость роста, лекарственная чувствительность, туберкулез легких, внелегочный туберкулез.

THE GROWTH RATE PHENOTYPIC PROPERTY OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL STRAINS: DEPENDENCE ON TUBERCULOSIS LOCALIZATION, TREATMENT, DRUG SUSCEPTIBILITY

Manicheva O.A.^a, Dogonadze M.Z.^a, Melnikova N.N.^a, Vishnevskiy B.I.^a, Manichev S.A.^b

^a St. Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The phenotypic properties of the *M. tuberculosis* strains obtained from patients with pulmonary or extra-pulmonary tuberculosis are determined by a complex set of factors: the genetic characteristics of the pathogen, its ability to adapt in vivo and in vitro, the influence of the host's immune system and chemotherapy. The growth rate as the phenotypic property is the most accessible for the study of the host-pathogen relationships at the level of host/strain population interactions. The aim of the study is to assess in vitro of the growth rate of *M. tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: untreated and treated (with surgical and non-surgical treatment) and also sensitive and resistant isolates in comparison with the reference strain H37Rv. To estimate the growth rate of 116 clinical isolates we have used the modified method originally developed by von Groll and co-authors: to get the bacteria growth curve the fluorescence intensity of growing strains (with indicator resazurin) has been measured daily for 8 days in 96-well plate. The growth rate is determined as the slope of the growth curve. The mean values of the growth rate have been calculated in the following groups of patients: 1 — untreated patients with pulmonary tuberculosis (PT), respiratory material; 2 — non-surgical treated PT patients, respiratory material; 3 — surgical treated PT patients (mainly with chronic and hyperchronic process), respiratory material; 4 — patients like in 3rd group, surgical material; 5 — bone and joint tuberculosis (BJT), surgical material. In addition, groups of sensitive and resistant strains have been examined, but there are no significant differences in growth rates. It has been obtained that the growth rate of strains isolated from the PT patients is higher than in BJT patients: it can be explained less favorable conditions for the pathogen vegetation in the BJT. In the case of a closed tuberculous lesion where the pathogen transmission to another host is impossible, then the selection of strains with the property to survive in the tissues of the osteoarticular system is impossible too, therefore it should be observed only an adaptation of the pathogen strain population to the individual host. The growth rate of isolates from untreated PT patients is higher than that of the treated ones. Comparison of the growth parameters of only MDR strains 1–5 groups to eliminate the influence of the sensitivity/resistance has resulted in the same conclusions. We suggest that the decrease in the growth rate of strains from the treated PT patients is in not only result of the treatment, but also is conditioned by adaptation of the pathogen to its external environment, which is the internal environment of the macroorganism. To confirm this assumption, the bacterial load of 1,083 diagnostic specimens grouped in a similar manner has been estimated, taking into account only MDR/XDR strains. In the group of treated patients the frequency of high bacterial load ($\text{CFU} \geq 100$) reached 52.5–63.8% that shows the conserved fitness of bacteria in such patients. The mean values of the growth rate of the strain H37Rv non-adapted to the macroorganism (due to numerous passages on artificial media) are higher than in all groups of clinical strains. Thus, heterogeneity of phenotypic properties of *M. tuberculosis* clinical strains on the basis of growth rate has been obtained. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains is depended on the tuberculosis localization (PT, BJT) and on the joint effect of patient treatment and pathogen adaptation to the host.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, clinical strains, drug resistance, pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis.

Введение

Туберкулез — динамический многофакторный процесс взаимодействия хозяин—патоген. Фенотипические свойства возбудителя «на выходе» из макроорганизма, то есть свойства конкретного штамма, полученного при посеве патологического материала на искусственные питательные среды, определяются как генетическими особенностями патогена, его способностью к адаптации *in vivo* и *in vitro*, так и воздействием на него комплекса факторов организма хозяина, который служит для *Mycobacterium tuberculosis* внешней средой.

Спектр изученных фенотипических свойств *M. tuberculosis* весьма широк. Лекарственная резистентность — наиболее изученное свойство вследствие постоянной востребованности в практической фтизиатрии. Однако устойчивость к противотуберкулезным препаратам формируется в первую очередь в результате селекции микобактерий с мутациями, обеспечивающими выживание возбудителя в организме больного при воздействии химиотерапии. Во вторую очередь на возникновение резистентности влияют особенности внутренней среды макроорганизма, отвечающего комплексом разнообразных реакций (от молекулярного до организменного уровня) на туберкулезную инфекцию, но это вопрос, заслуживающий отдельного рассмотрения [3].

Применение методов биоинформатики, достижения в области молекулярной генетики, транскриптомики, метаболомики, протеомики позволили получить громадный объем информации о возбудителе туберкулеза, его способности адаптироваться к различным условиям *in vivo* и *in vitro* (лишь некоторые работы и обзоры последних лет [2, 7, 14, 16, 17, 36]). Один из основных аспектов исследований — выявление генов и биомолекул, сопряженных с патогенностью/вирулентностью микобактерий, преимущественно в качестве мишеней для создания новых антимикобактериальных/антиинфекционных препаратов. Кроме того, исследуют фенотипические свойства в сопоставлении с фенотипическим же свойством лекарственной устойчивости и ассоциированными с ней генетическими мутациями [33, 34], принадлежностью штаммов к той или иной филогенетической линии [10, 19, 31, 39]. Немногие публикации касаются влияния макроорганизма на формирование фенотипических свойств микобактерий [1, 25]. Исследования системы хозяин-патоген в основном проводят в аспекте взаимодействия субъектов на молекулярном и клеточном (макрофаги *ex vivo*, кле-

точные линии) уровнях, либо при использовании экспериментальных моделей туберкулеза на животных [9, 13, 30]. Клинические аспекты этих отношений в основном ориентированы на фенотипическое свойство лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, либо генетические особенности возбудителя, изученные с помощью методов молекулярной эпидемиологии или генетики [11, 21, 35].

Наиболее доступным для исследования большого числа штаммов возбудителя с целью анализа взаимоотношений хозяин—патоген на уровне макроорганизм/штаммовая популяция *M. tuberculosis* является фенотипическое свойство — скорость роста.

В геноме *M. tuberculosis* обнаружены гены, экспрессия или ингибция которых определяет скорость размножения микобактерий *in vitro* и/или *in vivo*, переход в дормантное состояние [4, 20, 22, 23, 24, 26]. Скорость роста микобактерий в основном сопоставляют с их резистентностью к противотуберкулезным препаратам или принадлежностью к той или иной филогенетической линии [5, 6, 15]. Однако это свойство формируется не только под влиянием генетических особенностей штамма, но и в ходе адаптации микобактерий к особенностям внутренней среды организма хозяина. В нашем исследовании мы сосредоточили внимание на сопоставлении скорости роста не только с резистентностью к противотуберкулезным препаратам, но и с локализацией инфекции, а также влиянием химиотерапии (нелеченые пациенты, леченые, оперированные вследствие неэффективности терапии).

Цель работы — оценить *in vitro* скорость роста штаммов *M. tuberculosis*, выделенных из диагностического материала больных туберкулезом при легочной и внелегочной локализации, нелеченых и леченых, оперированных и неоперированных, а также чувствительных и устойчивых изолятов в сравнении с референтным штаммом H37Rv.

Материалы и методы

Исследовали 116 клинических штаммов *M. tuberculosis* из коллекции СПб НИИ фтизиопульмонологии, выделенных из материала 77 больных туберкулезом органов дыхания (ТОД) и 39 пациентов с костно-суставным туберкулезом (КСТ). В случае ТОД отбирали штаммы, выделенные преимущественно из первых трех образцов респираторного материала до начала лечения, в том числе повторного. Бактериальную массу первой или второй (в случае выделения только на жид-

кой среде) генерации изолята суспендировали в физиологическом растворе с 15% глицерина и замораживали при -80°C . Идентификация принадлежности к виду *M. tuberculosis* была проведена стандартными методами (Приказы № 109 от 21.03.2003 (ред. от 29.10.2009) № 951 от 29.12.2014). Лекарственная чувствительность к противотуберкулезным препаратам была определена непрямым методом абсолютных концентраций и/или с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960.

Кроме того, для оценки бактериальной нагрузки диагностического материала больных туберкулезом органов дыхания (ТОД) и пациентов с костно-суставным туберкулезом (КСТ) использовали данные о числе КОЕ (колониеобразующих единиц) в 1083 образцах (2009–2015 гг.) с выявленной при дальнейшем тестировании множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ).

Скорость роста исследуемых штаммов измеряли с помощью метода A. von Groll et al. [38] в нашей модификации. За 3 недели до опыта суспензию *M. tuberculosis* размораживали и высевали на среду Левенштейна–Йенсена. Суспензию бактериальной массы готовили следующим образом. Полную петлю культуры, осторожно снятую с косяка среды так, чтобы не задеть среду, вносили в сухую стерильную пробирку с 8–10 стеклянными шариками диаметром 3–5 мм. Бактериальную массу растирали с помощью шейкера «Вортекс» на максимальном числе оборотов, вносили 3–4 капли

бульона Миддлбука 7Н9 (Becton Dickinson, США) и вновь растирали. Затем добавляли 5 мл бульона Миддлбука и оставляли на 1 ч для осаждения конгломератов. Отбирали верхнюю часть супернатанта (объем 2 мл) и доводили его до плотности 1 ед. McFarland. Затем суспензию разводили в 40 раз бульоном Миддлбука с ростовой добавкой OADC (10%, Becton Dickinson, США), инокулировали в 96-луночный планшет (объем 200 мкл, по 8 лунок на штамм) и добавляли 30 мкл 0,01% водного раствора резазурина (Sigma-Aldrich). Флуоресценцию измеряли на планшетном ридере FLUOstar Optima (длина волны возбуждения — 530 нм, излучения — 590 нм) ежедневно в течение 8 дней. Для каждого штамма в формате программы Microsoft Excel строили кривую роста по средним значениям интенсивности флуоресценции каждого дня измерения и вычисляли ее наклон в условных единицах, характеризующих скорость роста. Опыты повторяли 2–6 раз, скорость роста каждого штамма оценивали в условных единицах, соответствующих средним значениям интенсивности флуоресценции, полученным во всех опытах.

В большинстве опытов с целью сравнения параллельно определяли скорость роста стандартного штамма H37Rv (TBC#1/47), полученного из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Лиофилизированную культуру высевали на среду Левенштейна–Йенсена и через 3 недели инкубации собирали бактериальную массу, сус-

Таблица. Структура лекарственной чувствительности штаммов *M. tuberculosis*

Table. Structure of drug sensitivity of *M. tuberculosis* strains

Группы Groups	Число штаммов (абс./%) Number of strains (abs./%)				
	чувствительных sensitive	полирезистентных drug-resistant	МЛУ MDR	ШЛУ XDR	Всего Total
ТОД, нелеченые, респираторный материал PT, untreated, respiratory specimens	2/6,5	5/16,1	21/67,7	3/9,7	31/100
ТОД, леченые неоперированные, респираторный материал PT, treated non-surgery, respiratory specimens	0	2/16,7	7/58,3	3/25,0	12/100
ТОД, леченые оперированные, респираторный материал PT, treated, surgery, respiratory specimens	0	0	9/32,1	19/67,9	28/100
ТОД, леченые оперированные, операционный материал PT, treated, surgery, surgical specimens	0	0	0	6/100	6/100
КСТ, операционный материал BJT, surgical specimens	10/25,6	6/15,4	22/56,4	1/2,6	39/100
Всего Total	12/10,3	13/11,2	59/50,9	32/27,6	116/100

Примечание. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, МЛУ — множественная лекарственная устойчивость, ШЛУ — широкая лекарственная устойчивость.

Note. PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, MDR — multidrug-resistance, XDR — extensively drug-resistant.

пендировали в физиологическом растворе с 15% глицерина и замораживали при -80°C . Во всех опытах использовали только вторую генерацию штамма, которую получали после трехнедельной инкубации размороженной суспензии, инокулированной на среду Левенштейна–Йенсена. Вычисляли среднее значение скорости роста H37Rv для всех серий опытов ($n = 10$).

Клинические штаммы *M. tuberculosis* объединяли в различные группы в зависимости от лечения, диагностического материала и локализации процесса: 1 группа — нелеченные (впервые выявленные) больные ТОД, респираторный материал ($n = 31$); 2 группа — леченные неоперированные больные ТОД, респираторный материал ($n = 12$); 3 группа — леченные оперированные больные ТОД (с хроническим и гиперхроническим течением процесса), респираторный материал ($n = 28$); 4 группа — аналогичные пациенты, операционный материал ($n = 6$); 5 группа — больные КСТ, операционный материал ($n = 39$). В каждой группе вычисляли среднее значение и доверительный интервал ($M \pm I$; при $p = 0,05$); значимость различий между группами определяли с помощью t -теста, критерия Манна–Уитни, критерия χ^2 Пирсона, используя программу SPSS.

Результаты

Структура лекарственной чувствительности исследованных штаммов *M. tuberculosis* приведена в таблице. Для всех групп характерно ее смещение в сторону множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивости. В общей сложности доля штаммов с МЛУ и ШЛУ достигала 78,5% числа исследованных изолятов. При ТОД процент изолятов *M. tuberculosis* с ШЛУ был больше в 2,6 и 7,0 раз во 2 и 3 группах в сравнении с первой. Все 6 исследованных штаммов, выделенных из операционного материала пациентов с ТОД, были с ШЛУ.

Скорость роста штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности приведена на рисунке 1. Скорость роста чувствительных штаммов значительно не отличалась от лекарственно-устойчивых штаммов (полирезистентных, МЛУ и ШЛУ), при этом отмечали значительную вариабельность параметров роста изолятов — размах выборки составлял 56,7–321,3 (чувствительные), 30,2–424,6 (МЛУ) и 10,2–423,1 (ШЛУ) усл.ед. Различия обнаружены между группами штаммов с полирезистентностью и ШЛУ ($p < 0,05$).

Мы сочли более корректным сравнение скорости роста чувствительных и устойчивых штаммов *M. tuberculosis* для изолятов только при КСТ, так как при ТОД даже у впервые выявленных (нелеченных) больных структура лекарственной чувствительности смещена в сторону МЛУ (табл.) и всего 2 штамма из 31 были чувствительными. Скорость роста чувствительных, полирезистентных и МЛУ изолятов (ШЛУ во внимание не принимали, так как был только один такой штамм) при КСТ была сходной (рис. 2).

В целом изоляты от больных ТОД (респираторный материал, $n = 71$) по средним значениям характеризовались большей скоростью роста, чем таковые при КСТ ($n = 39$): $215,6 \pm 25,2$ против $174,6 \pm 18,6$ усл. ед. ($p = 0,011$).

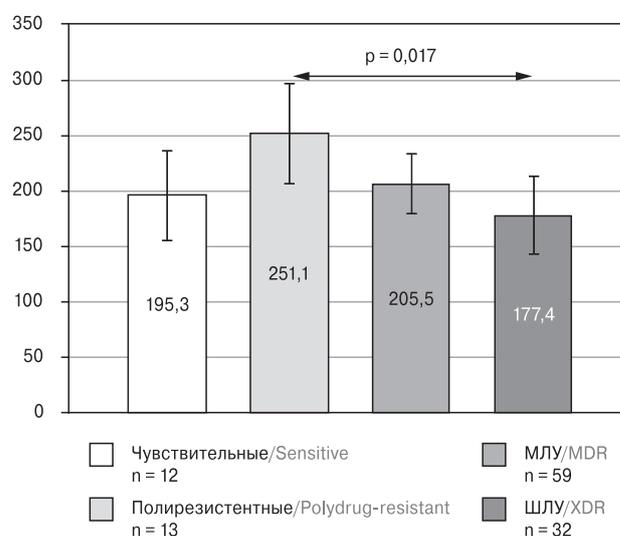


Рисунок 1. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности

Figure 1. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains with different drug susceptibility characteristics

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. В каждом опыте величину скорости роста представляли в условных единицах, считая ее равной наклону кривой, полученной при ежедневной флуоресцентной спектрометрии штамма и вычисленной с помощью программы MS Excel. Значение скорости роста для каждого штамма рассчитывали по данным 2–6 опытов, для группы — по данным параметров роста, входящих в нее штаммов. Стрелка указывает на значимые различия между группами.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval. In each experiment, the growth rate it was presented in conventional units, which we equated to the slope of the curve obtained with the daily fluorescence spectrometry of the strain and calculated in MS Excel. The growth rate for each strain were calculated with date of the 2–6 experiments, mean value for the group were calculated according to the data of strains included in it. The arrow showing significant differences between the groups.

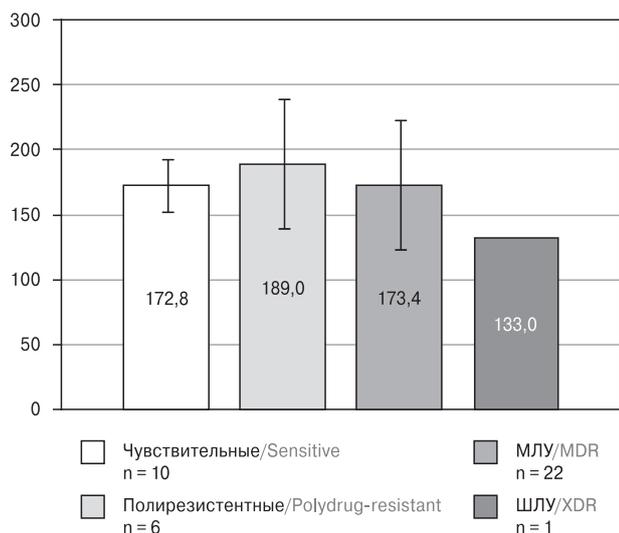


Рисунок 2. Скорость роста клинических штаммов *M. tuberculosis* с различными характеристиками лекарственной чувствительности при костно-суставном туберкулезе

Figure 2. The growth rate of *M. tuberculosis* clinical strains with different drug susceptibility characteristics in bone and joint tuberculosis.

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval.

Штаммы от больных ТОД различались по средним значениям скорости роста (рис. 3): изоляты из респираторного материала впервые выявленных (группа 1, $n = 31$) превосходили по параметрам роста штаммы от пациентов леченых неоперированных (группа 2, $n = 12$) в 1,40 раза ($U_{эмп.} = 119$, $U_{крит.} = 124$, $p < 0,05$), леченых оперированных (группа 3, $n = 28$) — в 1,32 раза ($p = 0,036$). При тенденции превышения скорости роста штаммов, выделенных из операционного материала, в сравнении с изолятами из респираторного материала оперированных пациентов (3 и 4 группы) значимой разницы не обнаружено ($p = 0,066$) вследствие разброса данных и небольшой выборки в четвертой группе ($n = 6$).

Скорость роста штаммов, выделенных из операционного материала больных КСТ, была значимо меньше таковой изолятов 1 (в 1,43 раза) и 4 групп (в 1,29 раза), не отличаясь при этом от 2-й и 3-й.

Все группы по средним значениям параметров роста были значимо меньше стандартного музейного штамма H37Rv (средние значения скорости роста при измерении в 10 сериях опытов). При этом скорость штаммов 1–5 групп составляла соответственно 70,9; 50,6; 52,3; 63,4

и 49,3% от скорости роста музейного штамма. Следует отметить, что доля изолятов, выделенных из респираторного материала леченых пациентов с ТОД, у которых скорость роста была не меньше таковой стандартного штамма H37Rv составляла 30,0% (12 из 40) против 58,1% (18 из 31) у нелеченых ($\chi^2 = 5,638$, $p = 0,018$).

Для того, чтобы исключить влияние фактора чувствительности, сравнили показатели роста только МЛУ штаммов (такие штаммы составляли большую долю всех исследованных изолятов) (рис. 4). При этом было выявлено ее превышение в 1,48 раза в 1 группе в сравнении со 2-й ($U_{эмп.} = 39$, $U_{крит.} = 41$, $p < 0,05$) и в 1,46 раза ($p = 0,008$) в сравнении с 5-й. Также следует отметить тенденцию к снижению скорости роста в 1,27 раза в 3 группе в сравнении с 1-й, однако малая выборка ($n = 9$, вследствие того, что штаммы с МЛУ составили всего 32,1% от числа всех штаммов в этой группе — 19 из 28) и разброс данных не позволили сделать заключение о значимости этих различий. Все 6 штаммов 4 группы (операционный материал леченых оперированных больных) были с ШЛУ, что не дало возможности включить эту группу в сравнительный анализ.

Бактериальная нагрузка диагностического материала, определяемая при его посеве на плотные питательные среды, в некоторой степени характеризует жизнеспособность штаммовой популяции *M. tuberculosis*. Для оценки возможного влияния лечения на данный показатель провели сравнение массивности роста 1083 МЛУ/ШЛУ штаммов возбудителя туберкулеза, выделенных от пациентов, находившихся в клиниках СПб НИИ фтизиопульмонологии в 2009–2015 гг. (рис. 5). В респираторном материале леченых оперированных больных с ТОД доля штаммов с высокой массивностью роста ($KOE \geq 100$) была наиболее высокой, превосходя группу нелеченых в 1,9 раза, леченых неоперированных — в 1,2 раза, КСТ — в 2,6 раза. Наименьшей доля таких штаммов была в группе 5 (КСТ), значимо отличаясь при этом от групп второй и четвертой в 2,2 раза, а третьей — в 2,6 раза.

Корреляции между скоростью роста исследованных субкультур и бактериальной нагрузкой диагностического материала, из которого были выделены исследованные штаммы, не обнаружено ($r = 0,01$).

Обсуждение

Высокий процент МЛУ/ШЛУ штаммов *M. tuberculosis* среди исследованных изолятов обусловлен тем, что в клиниках СПб НИИФ на-

ходятся на лечении преимущественно пациенты с лекарственно-устойчивым туберкулезом. В связи с этим выборка лекарственно-чувствительных изолятов была небольшой.

Доводы в пользу применения метода REMA (Resazurin Microdilution Assay), модифицированного для определения скорости роста штаммов *M. tuberculosis*, в сравнении с измерением плотности суспензий, определением КОЕ, использованием системы BACTEC MGIT, приведены в работе A. von Groll et al. [38]: простота, быстрота, экономичность. В нашей работе для регистрации результата в отличие от указанно-

го выше исследования мы использовали более чувствительную в сравнении с адсорбционной флуоресцентную спектрофотометрию, так как при длине возбуждающей волны 530 нм интенсивность свечения восстановленной формы (резорурфина, образующегося при воздействии окислительно-восстановительных ферментов живых клеток на резазурин) многократно превосходит таковую окисленной (резазурин) формы индикатора, в отличие от адсорбционной спектрофотометрии, при которой площадь перекрытия спектров значительна (Parrot, 2003). Кроме того, мы выстраивали кривую роста

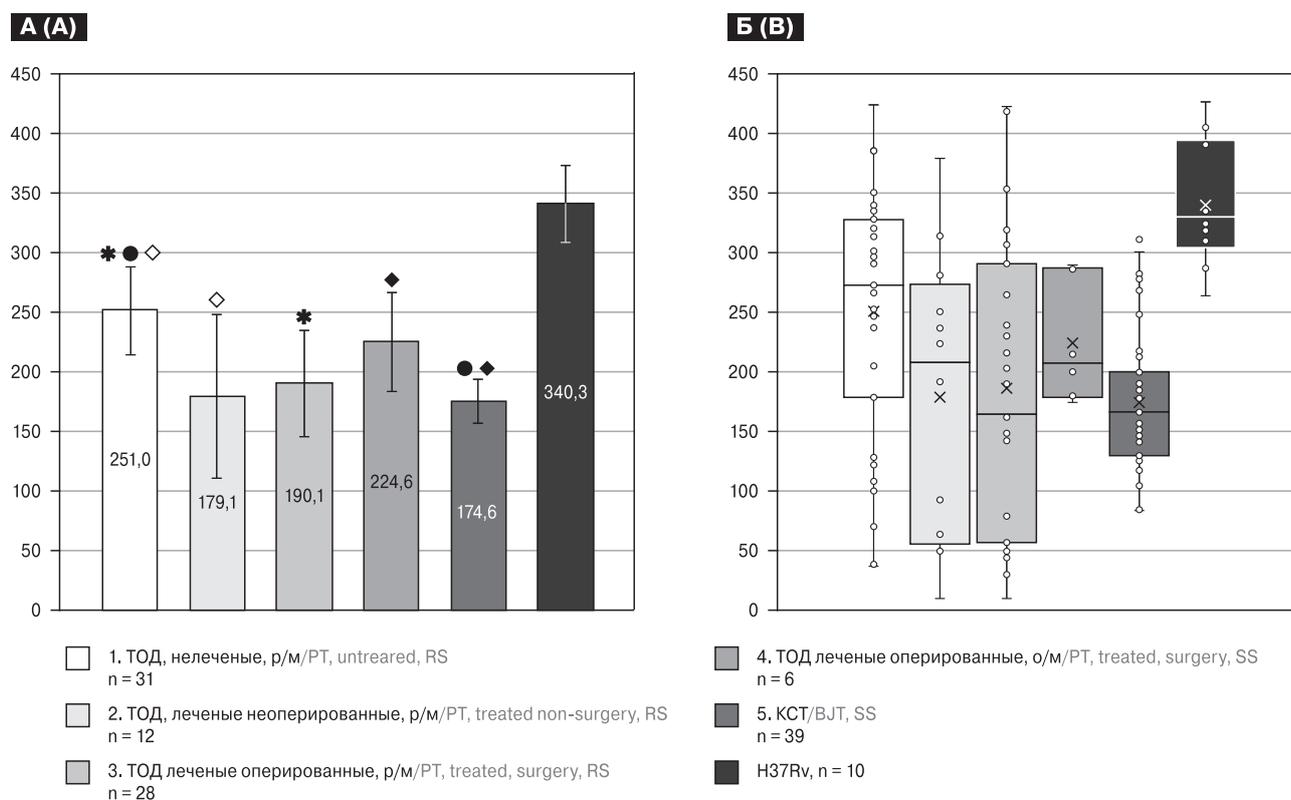


Рисунок 3. Скорость роста штамма H37Rv и изолятов *M. tuberculosis* в зависимости от лечения и локализации процесса

Figure 3. The growth rate of the *M. tuberculosis* H37Rv and clinical strains depending on the treatment and localization of the process.

А) Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, р/м — респираторный материал, о/м — операционный материал; значимые различия между группами по критерию t: * — $p = 0,036$, ● — $p = 0,026$; по критерию Манна-Уитни: ◇ — $U_{\text{эмп.}} = 119$, $U_{\text{крит.}} = 124$, $p < 0,05$, ◆ — $U_{\text{эмп.}} = 55$, $U_{\text{крит.}} = 69$, $p < 0,05$. Б) Бокс-плоты показывают распределение значений скорости роста в группах. Легенда та же. Кружки — значения скорости роста; верхняя и нижняя грани прямоугольников — значения верхних и нижних квартилей, пересекающая прямоугольники прямая — медиана, верхние и нижние отрезки — максимальные и минимальные значения, x — средние значения.

А) The growth rate mean values (conventional units) with a confidence interval (95% CI); PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, RS — respiratory specimens; SS — surgical specimens; significant differences between groups by the t criterion: * — $p = 0.036$, ● — $p = 0.026$; by the Mann-Whitney criterion: ◇ — $U_{\text{emp.}} = 119$, $U_{\text{crit.}} = 124$, $p < 0.05$, ◆ — $U_{\text{emp.}} = 55$, $U_{\text{crit.}} = 69$, $p < 0.05$. Б) Box plots showing the distribution of growth rates in groups. The legend is the same. Circles — the values of the growth rate; the upper and lower rectangle faces are the values of the upper and lower quartiles, the line intersecting the rectangle is the median, the upper and lower line segments are the maximum and minimum values, x — the mean values.

и вычисляли ее наклон, который по сути и отражает скорость роста — изменение параметра интенсивности флуоресценции в единицу времени, а не фиксированную точку во времени, к которой штамм достигает определенного числа ростовых единиц [37] или оптической плотности [8].

Средние значения скорости роста чувствительных и МЛУ/ШЛУ штаммов значимо не отличались как в целом, так и внутри группы КСТ. Сходные результаты получены F.S. Spies с соавт. [34]. Это согласуется с данными литературы о сохранении жизнеспособности у резистентных к рифампицину изолятов за счет компенсаторных мутаций [12]. С другой стороны, наши результаты отличаются от данных N.S. Morcillo et al. [27], которые при определе-

нии параметров относительного (по отношению к стандартному штамму H37Rv) фитнеса исследуемых штаммов (выделенных от эпидемиологически связанных пациентов), обнаружили его уменьшение у МЛУ штаммов в сравнении с чувствительными и лекарственно-устойчивыми, при этом степень резистентности штамма к противотуберкулезным препаратам (значения минимальной ингибирующей концентрации) не коррелировала с параметрами фитнеса.

Поскольку большую часть чувствительных штаммов (10 из 12) составляли изоляты, выделенные при КСТ, провели сравнение скорости роста чувствительных и устойчивых *M. tuberculosis* внутри этой группы. Отсутствие значимых различий подтвердило наше предположение о большем влиянии на параметры роста локализации туберкулеза, нежели фактора лекарственной чувствительности/устойчивости.

Возможное объяснение значимо большей скорости роста полирезистентных штаммов в сравнении с МЛУ изолятами — из 13 полирезистентных штаммов только 1 штамм был устойчив к рифампицину. Известно, что мутации в гене *rpoB* уменьшают фитнес микобактерий, а компенсаторные мутации могут его восстанавливать [12]. Вероятно, чувствительность к рифампицину приближает штамм по параметрам фитнеса к «дикому» типу.

Параметры роста штаммов, выделенных из материала больных ТОД, значимо превышали таковые при КСТ. Это закономерно, учитывая менее благоприятные условия вегетации возбудителя при КСТ. Поскольку при локализации туберкулезного поражения, отграниченного от внешней среды, невозможна передача возбудителя к другому хозяину, то невозможна и селекция штаммов по способности выживать в тканях костно-суставной системы, следовательно, в этом случае следует говорить об адаптации штаммовой популяции патогена к индивидуальному хозяину.

Скорость роста изолятов от нелеченых пациентов по средним значениям была значимо выше, чем у леченых. Сравнение параметров роста только МЛУ штаммов 1–4 групп для устранения влияния фактора чувствительности/устойчивости в целом выявило ту же картину. Для ответа на вопрос является ли уменьшение скорости роста изолятов от леченых больных только следствием лечения, угнетающего жизнеспособность микобактерий, или он действует вкупе с фактором их адаптации к макроорганизму, оценили, во-первых, массивность роста МЛУ/ШЛУ штаммов при

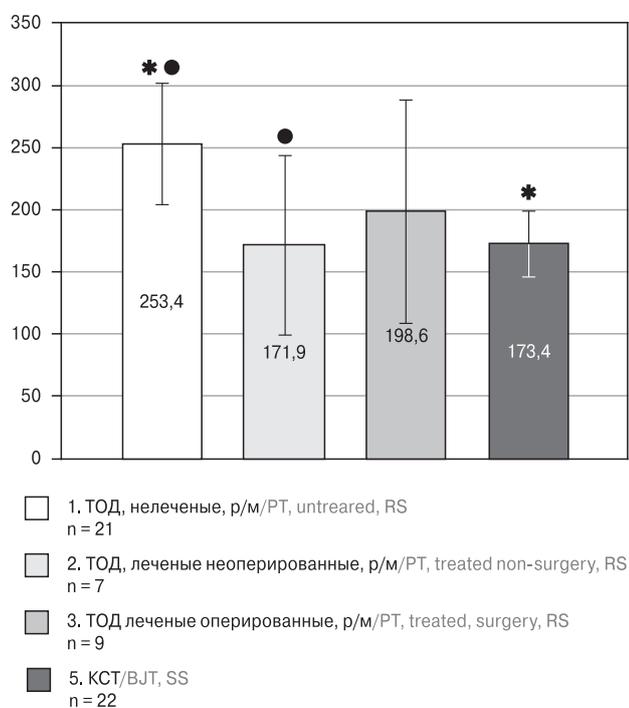


Рисунок 4. Скорость роста клинических МЛУ штаммов *M. tuberculosis*

Figure 4. The growth rate of the *M. tuberculosis* MDR clinical strains

Примечание. Средние значения скорости роста (в усл. ед.) с 95% доверительным интервалом. ТОД — туберкулез органов дыхания, КСТ — костно-суставной туберкулез, р/м — респираторный материал, о/м — операционный материал. Различия между группами значимы:

* — по критерию t , $p = 0,008$; ● — по критерию Манна-Уитни, $U_{эмп.} = 37$, $U_{крит.} = 41$, $p < 0,05$.

Note. The growth rate mean values (conventional units) with the 95% confidence interval. PT — pulmonary tuberculosis, BJT — bone and joint tuberculosis, RS — respiratory specimens; SS — surgical specimens. Significant differences between groups: * — by the criterion t , $p = 0,008$; ● — by the Mann-Whitney criterion, $U_{эмп.} = 37$, $U_{крит.} = 41$, $p < 0,05$.

посеве диагностического материала пациентов схожих групп ($n = 1083$). Было выявлено, что у леченых больных доля штаммов с КОЕ ≥ 100 значимо выше, чем у нелеченых пациентов и при КСТ. Это свидетельствует о том, что лечение и само по себе наличие МЛУ/ШЛУ не сказывается на жизнеспособности *M. tuberculosis*. Во-вторых, мы сравнили параметры роста клинических штаммов и музейного штамма H37Rv. Этот штамм в течение многих лет культивировался на искусственных питательных средах, сохраняется он в коллекциях (например, АТТС — в США, коллекции микроорганизмов в НЦЭСМП, РФ) в лиофилизированном или замороженном виде. Несмотря на длительные пассажи штамм не потерял способности вызывать туберкулезные изменения на моделях разных видов животных и потому используется как эталонный в самых разнообразных исследованиях. История используемого нами штамма H37Rv восходит к 1948 г., когда штаммы поддерживались путем многократных пересевов, поэтому мы рассматривали этот штамм как референтный не адаптированный к макроорганизму, но адаптированный к росту на искусственных питательных средах, как образец для сравнения с ним адаптированных к хозяину клинических изолятов. По средним значениям скорости роста H37Rv значимо превышал таковые исследованных изолятов во всех группах. При этом относительно H37Rv скорость роста была наибольшей в группе нелеченых больных — 70,9%. В остальных группах (леченые, КСТ), за исключением операционного материала леченых пациентов с ТОД (небольшое число таких изолятов не позволяет сделать корректный вывод), параметры роста клинических штаммов составляли около половины значений скорости роста референтного не адаптированного штамма H37Rv — 50,6; 52,3; 49,3%. И, в-третьих, параметры роста мы регистрировали у субкультур (2–4 генерации), в искусственной питательной среде, при отсутствии в ней противотуберкулезных препаратов.

Снижение скорости роста *M. tuberculosis*, выделенных от леченых пациентов, мы считаем результатом не только лечения, но и адаптации патогена к его окружающей среде — внутренней среде макроорганизма. Способность лекарственно-устойчивых микобактерий к адаптации к хозяину подтверждена в работе S.H. Gillespie et al. [18]. Возможно, снижение темпа репликации — это один из путей к переходу в дормантное состояние, которому способствует воздействие на патоген факторов иммунной защиты хозяина. Так, на модели экспериментального туберкулеза у мышей

в тканях легких были выявлены микобактерии не способные к росту, но сохраняющие метаболическую активность, при этом такие формы отсутствовали у мышей с генетически обусловленным недостатком синтеза IFN γ , то есть при иммунокомпрометированности [23].

Таким образом, штаммы *M. tuberculosis* различаются по фенотипическому свойству ско-

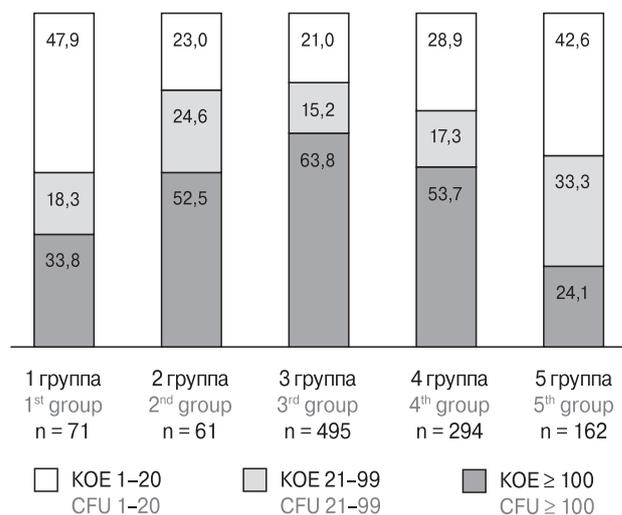


Рисунок 5. Бактериальная нагрузка диагностического материала (данные 2009–2015 гг.) при МЛУ/ШЛУ туберкулезе

Figure 5. The bacterial loads of the diagnostic material (data 2009–2015) in MDR/XDR tuberculosis

Примечание. В каждой группе указана доля образцов (в %) с низкой (1–20 КОЕ), средней (21–99 КОЕ) и высокой (≥ 100 КОЕ) бактериальной нагрузкой. 1 группа — нелеченые пациенты с ТОД, респираторный материал; 2 группа — леченые не оперированные пациенты с ТОД, респираторный материал; 3 группа — леченые оперированные пациенты с ТОД, респираторный материал; 4 группа — леченые оперированные пациенты с ТОД, операционный материал; 5 группа — пациенты с туберкулезом костно-суставной системы, операционный материал. Различия для КОЕ ≥ 100 между группами: 1 и 2 — $\chi^2 = 4,675$, $p = 0,031$; 1 и 3 — $\chi^2 = 23,354$, $p < 0,001$; 1 и 4 — $\chi^2 = 9,094$, $p = 0,003$; 2 и 5 — $\chi^2 = 16,452$, $p < 0,001$; 3 и 4 — $\chi^2 = 7,840$, $p = 0,005$; 3 и 5 — $\chi^2 = 77,703$, $p < 0,001$; 4 и 5 — $\chi^2 = 37,465$, $p < 0,001$.

Note. Each group showing the percentage of samples with low (1–20 CFU), medium (21–99 CFU) and high (≥ 100 CFU) bacterial load. 1 group — untreated pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 2 group — treated non-surgery pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 3 group — treated surgery pulmonary tuberculosis patients, respiratory specimens; 4 group — treated surgery pulmonary tuberculosis patients, surgical specimens; 5 group — bone and joint tuberculosis patients, surgical specimens. Significant differences for CFU ≥ 100 between the groups: 1 and 2 — $\chi^2 = 4.675$, $p = 0.031$; 1 and 3 — $\chi^2 = 23.354$, $p < 0.001$; 1 and 4 — $\chi^2 = 9.094$, $p = 0.003$; 2 and 5 — $\chi^2 = 16.452$, $p < 0.001$; 3 and 4 — $\chi^2 = 7.840$, $p = 0.005$; 3 and 5 — $\chi^2 = 77.703$, $p < 0.001$; 4 and 5 — $\chi^2 = 37.465$, $p < 0.001$.

рости роста. Поскольку скорости роста чувствительных и МЛУ/ШЛУ изолятов сходны, а показатели роста штаммов, выделенных от пациентов с ТОД и КСТ, различаются, то можно сделать вывод, что на формирование данного фенотипического свойства *M. tuberculosis* в значительной мере влияет локализация туберкулезного процесса. Снижение репликации микобактерий можно трактовать как ответ патогена на неблагоприятные условия вегетации в костно-суставной ткани. Известные данные о трудностях бактериологической диагностики КСТ, связанные с частой олигобациллярностью и сниженной ферментативной активностью, косвенно можно объяснить и выявленной пониженной скоростью роста *M. tuberculosis* при этой локализации.

Уменьшение скорости роста изолятов, выделенных от леченых пациентов ТОД в сравнении с нелечеными мы объясняем не столько наличием собственно лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis*, сколько совместным влиянием двух факторов: лечения и адаптации патогена к макроорганизму при длительной его вегетации. В пользу значимости фактора адаптации свидетельствует, во-первых, факт сохранения

жизнеспособности патогена у леченых пациентов с ТОД, вызванным штаммами микобактерий с МЛУ/ШЛУ, что проявляется в большой частоте (52,5–63,8%) высокой бактериальной нагрузки (КОЕ \geq 100) диагностического материала. Во-вторых, у большинства (70,0%) изолятов от леченых пациентов с ТОД скорость роста меньше, чем темп репликации референтного не адаптированного к макроорганизму (вследствие длительных пассажей на питательных средах) штамма H37Rv. В-третьих, скорость роста определяли у субкультур (2–4 генерации) в жидкой питательной среде, то есть без непосредственного влияния противотуберкулезных препаратов на штамм в момент исследования. Необходимы дальнейшие исследования фенотипического свойства скорости роста в зависимости от генетических особенностей возбудителя и лечения.

Благодарность

Благодарим Н.С. Соловьеву, заведующую бактериологической лабораторией СПбНИИФ, за предоставленную информацию о КСТ штаммах *M. tuberculosis*.

Список литературы/References

1. Arcos J., Sasindran S.J., Fujiwara N., Turner J., Schlesinger L.S., Torrelles J.B. Human lung hydrolases delineate mycobacterium tuberculosis-macrophage interactions and the capacity to control infection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 1, pp. 372–381. doi: 10.4049/jimmunol.1100823
2. Balázs G., Heath A.P., Shi L., Gennaro M.L. The temporal response of the Mycobacterium tuberculosis gene regulatory network during growth arrest. *Mol. Syst. Biol.*, 2008, vol. 4, no. 225, pp. 1–8. doi: 10.1038/msb.2008.63
3. Ben-Kahlia I., Al-Hajjaj S. Drug-resistant tuberculosis viewed from bacterial and host genomes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2016, vol. 48, iss. 4, pp. 353–360. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.010
4. Beste D.J.V., Espasa M., Bonde B., Kierzek A.M., Stewart G.R., McFadden J. The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PLoS One*, 2009, vol. 4, iss. 4: e5349. doi: 10.1371/journal.pone.0005349
5. Bhattar P., Chatterjee A., D'souza D., Tolani M., Mistry N. Estimating fitness by competition assays between drug susceptible and resistant mycobacterium tuberculosis of predominant lineages in Mumbai, India. *PLoS One*, 2012, vol. 7, iss. 3:e33507. doi: 10.1371/journal.pone.0033507
6. Bhattar P., Mistry N. Fitness of acquired drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from DOTS compliant patients. *Tuberculosis*, 2013, vol. 93, iss. 4, pp. 418–424. doi: 10.1016/j.tube.2013.03.006
7. Bretl D.J., Demetriadou C., Zahrt T.C. Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of mycobacterium tuberculosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2011, vol. 75, no. 4, pp. 566–582. doi: 10.1128/MMBR.05004-11
8. Casart Y., Turcios L., Florez I., Jaspe R., Guerrero E., de Waard J., Aguilar, D., Hernández-Pando R., Salazar L. IS6110 in oriC affects the morphology and growth of Mycobacterium tuberculosis and attenuates virulence in mice. *Tuberculosis*, 2008, vol. 88, iss. 6, pp. 545–552. doi: 10.1016/j.tube.2008.03.006
9. Chandra N., Kumar D., Rao K. Systems biology of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2011, vol. 91, iss. 5, pp. 487–496. doi: 10.1016/j.tube.2011.02.008
10. Chen Y.-Y., Chang J.-R., Huang W.-F., Hsu S.-C., Kuo S.-C., Sun J.-R., Dou H.Y. The pattern of cytokine production in vitro induced by ancient and modern Beijing mycobacterium tuberculosis strains. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 4: e94296. doi: 10.1371/journal.pone.0094296
11. Click E.S., Winston C.A., Oeltmann J.E., Moonan P.K., Mac Kenzie W.R. Association between Mycobacterium tuberculosis lineage and time to sputum culture conversion. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2013, vol. 17, no. 7, pp. 878–884. doi: 10.5588/ijtld.12.0732
12. Comas I., Borrell S., Roetzer A., Rose G., Malla B., Kato-Maeda M., Galagan J., Niemann S., Gagneux S. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat. Genet.*, 2011, vol. 44, no. 1, pp. 106–110. doi: 10.1038/ng.1038
13. Dey B., Bishai W.R. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. *Semin. Immunol.*, 2014, vol. 26, iss. 6, pp. 486–496. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.002

14. Eoh H. Metabolomics: a window into the adaptive physiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 2014, vol. 94, iss. 6, pp. 538–543. doi: 10.1016/j.tube.2014.08.002
15. Faksri K., Chaiprasert A., Pardieu C., Casali N., Palaga T., Palittapongarnpim P., Prayoonwivat N., Drobniowski F. Heterogeneity of phenotypic characteristics of the modern and ancestral Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian. Pac. J. Allergy Immunol.*, 2014, vol. 32, no. 2, pp. 124–132. doi: 10.12932/AP0361.32.2.2013
16. Flores-Villalva S., Rogriguez-Hernandez E., Rubio-Venegas Y., Canto-Alarcon J.G., Milian-Suazo F. What can proteomics tell us about tuberculosis? *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 25, no. 8, pp. 1181–1194. doi: 10.4014/jmb.1502.02008
17. Forrellad M.A., Klepp L.I., Gioffré A., Sabio y García J., Morbidoni H.R., de la Paz Santangelo M., Cataldi A.A., Bigi F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 2013, vol. 4, iss. 1, pp. 3–66. doi: 10.4161/viru.22329
18. Gillespie S.H., Billington O.J., Breathnach A., McHugh T.D. Multiple drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: evidence for changing fitness following passage through human hosts. *Microb. Drug Resist.*, 2002, vol. 8, iss. 4, pp. 273–279. doi: 10.1089/10766290260469534
19. Gomes L.L., Vasconcellos S.E.G., Gomes H.M., Elias A.R., Da Silva Rocha A., Ribeiro S.C.M., Panunto A.C., Ferrazoli L., Da Silva Telles M.A., De Ivens A.M.E., Kritski A.L., Mokrousov I., Manicheva O.A., Lasunskaja E., Suffys P.N. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, suppl. 1, pp. 190–196. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.025
20. Griffin J.E., Gawronski J.D., DeJesus M.A., Ioerger T.R., Akerley B.J., Sasseti C.M. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 9: e1002251. doi: 10.1371/journal.ppat.1002251
21. Hang N.T.L., Maeda S., Keicho N., Thuong P.H., Endo H. Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment. *Tuberculosis*, 2015, vol. 95, iss. 3, pp. 336–342. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.040
22. Hu Y., Movahedzadeh F., Stoker N.G., Coates A.R.M. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* α -crystallin-like hspX gene causes increased bacterial growth in vivo. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 2, pp. 861–868. doi: 10.1128/iai.74.2.861
23. Kurtz S., McKinnon K.P., Runge M.S., Ting J.P.-Y., Braunstein M. The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 12, pp. 6855–6864. doi: 10.1128/IAI.01022-06
24. Lamichhane G., Raghunand T.R., Morrison N.E., Woolwine S.C., Tyagi S., Kandavelou K., Bishai W.R. Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal atpase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 194, iss. 9, pp. 1233–1240. doi: 10.1086/508288
25. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, iss. 1, pp. 32–46. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.016
26. Martinot A.J., Farrow M., Bai L., Layre E., Cheng T.-Y., Tsai J.H., Iqbal J., Annand J.W., Sullivan Z.A., Hussain M.M., Sacchetti J., Moody D.B., Seeliger J.C., Rubin E.J. *Mycobacterial* metabolic syndrome: LprG and Rv1410 regulate triacylglyceride levels, growth rate and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.*, 2016, vol. 12, no. 1: e1005351. doi: 10.1371/journal.ppat.1005351
27. Morcillo N.S., Imperiale B.R., Di Giulio Á., Zumárraga M.J., Takiff H., Cataldi Á.A. Fitness of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and the impact on the transmission among household contacts. *Tuberculosis*, 2014, vol. 94, iss. 6, pp. 672–677. doi: 10.1016/j.tube.2014.08.003
28. Naidoo C.C., Pillay M. Increased in vitro fitness of multi- and extensively drug-resistant F15/LAM4/KZN strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014, vol. 20, iss. 6, pp. O361–O369. doi: 10.1111/1469-0691.12415
29. Perrot S., Dutertre-Catella H., Martin C., Warnet J.-M., Rat P. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. *Cytometry*, 2003, Part A, vol. 55A, iss. 1, pp. 7–14. doi: 10.1002/cyto.a.10067
30. Reiling N., Homolka S., Walter K., Brandenburg J., Niwinski L., Ernst M., Herzmann C., Lange C., Diel R., Ehlers S., Niemann S. Clade-specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice. *MBio*, 2013, vol. 4, no. 4: e00250-13. doi: 10.1128/mBio.00250-13
31. Romero M.M., Balboa L., Basile J.I., López B., Ritacco V., de la Barrera S.S., Sasiain M.C., Barrera L., Alemán M. Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* differ in their ability to induce respiratory burst and apoptosis in neutrophils as a possible mechanism of immune escape. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, vol. 2012, 11 p. doi: 10.1155/2012/152546
32. Schierloh P., Klepp L., Vazquez C., Rocha R.V., Blanco F.C., Balboa L., Schierloh P., Klepp L., Vazquez C., Rocha R.V., Blanco F.C., Balboa L., López B., Ritacco V., Bigi F., Sasiain M.C. Differential expression of immunogenic proteins on virulent *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014, 13 p. doi: 10.1155/2014/741309
33. Smith K.L.J., Saini D., Bardarov S., Larsen M., Frothingham R., Gandhi N.R., Jacobs Jr.W.R., Sturm A.W., Lee S. Reduced virulence of an extensively drug-resistant outbreak strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS One*, 2014, vol. 9, iss. 4: e94953. doi: 10.1371/journal.pone.0094953
34. Spies F.S., von Groll A., Ribeiro A.W., Ramos D.F., Ribeiro M.O., Regina E., Costa D., Martin A., Carlos J., Lucia M., Zaha A., Eduardo P., Silva A. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the rpsL, rrs, rpoB, and katG genes. *Tuberculosis*, 2013, vol. 93, iss. 2, pp. 150–154. doi: 10.1016/j.tube.2012.11.004
35. Stavrum R., PrayGod G., Range N., Faurholt-Jepsen D., Jeremiah K., Faurholt-Jepsen M., Jeremiah K., Faurholt-Jepsen M., Krarup H., Aabye M.G., Chagalucha J., Friis H., Andersen A.B., Grewal H.Ms. Increased level of acute phase reactants in patients infected with modern *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Mwanza, Tanzania. *BMC Infect. Dis.*, 2014, vol. 14, pp. 309–321. doi: 10.1186/1471-2334-14-309
36. Swanepoel C.C., Loots D.T. The use of functional genomics in conjunction with metabolomics for *Mycobacterium tuberculosis* research. *Dis. Markers*, 2014, vol. 2014, 12 p. doi: 10.1155/2014/124218

37. Toungousova O.S., Caugant D.A., Sandven P., Mariandyshev A.O., Bjune G. Impact of drug resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing genotype. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 42, iss. 3, pp. 281–290. doi: 10.1016/j.femsim.2004.05.012
38. Von Groll A., Martin A., Portaels F., da Silva P.E.A., Palomino J.C. Growth kinetics of Mycobacterium tuberculosis measured by quantitative resazurin reduction assay: a tool for fitness studies. *Brazilian J. Microbiol.*, 2010, vol. 41, no. 2, pp. 300–303. doi: 10.1590/S1517-83822010000200006
39. Von Groll A., Martin A., Stehr M., Singh M., Portaels F., da Silva P.E.A., Palomino J.C. Fitness of mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype. *PLoS One*, 2010, vol. 5, iss. 4: e10191. doi: 10.1371/journal.pone.0010191

Авторы:

Маничева О.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Догонадзе М.З., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Мельникова Н.Н., к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Вишнеvский Б.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Маничев С.А., к.псх.н., доцент, зав. кафедрой эргономики и инженерной психологии ФГБУ СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Manicheva O.A., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Dogonadze M.Z., PhD (Biology), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Melnikova N.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Vishnevskiy B.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Researcher, St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation;
Manichev S.A., PhD (Psychology), Associate Professor, Head of the Department of Ergonomics and Engineering Psychology, St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
Принята к печати 27.02.2018

Received 11.07.2017
Accepted 27.02.2018

ДИНАМИКА IL-2 У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ С УЧЕТОМ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

В.С. Елисеева¹, С.П. Кругляк¹, Л.Ф. Скляр¹, Е.В. Маркелова², Н.А. Боровская²

¹ ГБУЗ ККБ № 2 Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет, г. Владивосток, Россия

Резюме. Интерлейкин-2 (IL-2) является одним из важнейших цитокинов, участвующих в процессах регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Его основная иммунологическая функция состоит в регуляции специфического (антигензависимого) иммунного ответа путем стимуляции пролиферации и дифференцировки иммунных клеток, участвующих в его реализации, в том числе Т-лимфоцитов. Дисфункция клеточного звена иммунитета является основным патогенетическим механизмом развития ВИЧ-инфекции. Цель работы: выявление закономерностей изменения уровней IL-2 у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне сформированной лекарственной резистентности на поздних стадиях инфекции. В исследование включены 83 пациента с ВИЧ-инфекцией, получающих высокоактивную антиретровирусную терапию; контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови. У всех пациентов проведено исследование эффективности антиретровирусной терапии, включающее оценку вирусной нагрузки ВИЧ и уровней CD4⁺ Т-лимфоцитов. У пациентов с неэффективной антиретровирусной терапией дополнительно проведено исследование лекарственной устойчивости ВИЧ методом секвенирования по Сенгеру. По результатам секвенирования генома ВИЧ-инфицированные пациенты с неэффективной антиретровирусной терапией были разделены на две подгруппы — с выявленной лекарственной резистентностью (58,5%) и отсутствием детектируемых мутаций резистентности в геноме (41,5%). У всех лиц, включенных в исследование, измерены уровни IL-2 методом иммуноферментного анализа. При сравнении уровней IL-2 между группами пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне антиретровирусной терапии (вирусная нагрузка выявляется) с лекарственной устойчивостью и без нее были получены достоверные различия ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,95 \pm 0,29$ пг/мл соответственно, $p \leq 0,05$, U-критерий). Содержание IL-2 статистически значимо ниже в группе пациентов, не достигших успеха на фоне антиретровирусной терапии, чем в группе пациентов с эффективностью лечения ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл соответственно, $p < 0,001$, U-критерий). Таким образом, показано, что у пациентов с выявленной лекарственной резистентностью на фоне прогрессирования ВИЧ-инфекции происходит снижение уровней IL-2. Увеличение его уровней у пациентов с ВИЧ-инфекцией, достигших вирусологического и иммунологического успеха проводимой терапии связано с восстановлением числа продуцирующих данный цитокин иммунных клеток (Т-лимфоцитов). Мы предполагаем, что значительное снижение уровней IL-2 вносит дополнительный вклад в нарушение процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток при ВИЧ-инфекции, что приобретает большое значение при формировании лекарственной устойчивости ВИЧ в условиях постоянно сохраняющейся вирусной репликации.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, лекарственная резистентность, цитокины, IL-2, ВААРТ, мутации.

Адрес для переписки:

Елисеева Виктория Сергеевна
690011, Россия, г. Владивосток, ул. Борисенко, 50, ГБУЗ Краевая клиническая больница № 2, Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями.
Тел.: 8 (423) 263-62-24 (служебн.).
E-mail: vic-eliseeva@mail.ru

Contacts:

Viktoria S. Eliseeva
690011, Russian Federation, Vladivostok, Borisenko str., 50, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases.
Phone: +7 (423) 263-62-24 (office).
E-mail: vic-eliseeva@mail.ru

Библиографическое описание:

Елисеева В.С., Кругляк С.П., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Боровская Н.А. Динамика IL-2 у пациентов с ВИЧ-инфекцией с учетом лекарственной резистентности // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 187–194. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-187-194

Citation:

Eliseeva V.S., Kruglak S.P., Sklar L.F., Markelova E.V., Borovskaya N.A. Dynamics of IL-2 plasma levels in HIV patients with considering drugs resistance // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 187–194. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-187-194

DYNAMICS OF IL-2 PLASMA LEVELS IN HIV PATIENTS WITH CONSIDERING DRUGS RESISTANCEEliseeva V.S.^a, Kruglak S.P.^a, Sklar L.F.^a, Markelova E.V.^b, Borovskaya N.A.^b^a Center for prevention and control of AIDS and infectious diseases, Vladivostok, Russian Federation^b Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Interleukin-2 (IL-2) is one of the most important cytokines involved in the regulation of innate and adaptive immunity. Its main immunological function is to regulate a specific (antigen-dependent) immune response by stimulating proliferation and differentiation of immune cells involved in its realization, including T-lymphocytes. Dysfunction of cellular immunity is the main pathogenetic mechanism for the development of HIV infection. Objective: to identify patterns of IL-2 levels change in HIV-infected patients on the background of drug resistance at the later stages of infection. The study included 83 patients with HIV infection receiving highly active antiretroviral therapy; the control group consisted of 20 healthy blood donors. All patients underwent a study of the effectiveness of antiretroviral therapy, including an assessment of HIV viral load and CD4⁺ T lymphocyte levels. In patients with ineffective antiretroviral therapy, a study of drug resistance to HIV by Sanger sequencing was additionally conducted. According to the results of genome sequencing, HIV-infected patients with ineffective antiretroviral therapy were divided into two subgroups — with revealed drug resistance (58.5%) and absence of detectable resistance mutations in the genome (41.5%). Levels of IL-2 were measured in all persons included in the study by the method of enzyme immunoassay. When comparing the levels of IL-2 between groups of patients with continuing viral load on the background of antiretroviral therapy (viral load is detected) with drug resistance and without it, significant differences were obtained (1.75 ± 0.26 pg/ml versus 1.95 ± 0.29 pg/ml, $p \leq 0.05$, U-criterion, respectively). The content of IL-2 is statistically significantly lower in the group of patients who did not succeed with antiretroviral therapy than in the group of patients with treatment efficacy (1.83 ± 0.29 pg/ml versus 4.89 ± 0.55 pg/ml, respectively, $p < 0.001$, U-criterion). Thus, it is shown that in patients with revealed drug resistance against the background of progression of HIV infection there is a decrease in levels of IL-2. The increase in its levels in patients with HIV infection who have reached virological and immunological success of therapy is due to the reduction in the number of the cytokine-producing immune cells (T-lymphocytes). We assume that a significant decrease in the levels of IL-2 makes an additional contribution to the disruption of the processes of proliferation and differentiation of immunocompetent cells in HIV infection, which is of great importance in the formation of drug resistance of HIV in conditions of constant viral replication.

Key words: HIV infection, drugs resistance, cytokines, IL-2, HAART, mutations.

Введение

В настоящее время ВИЧ-инфекция стала управляемым заболеванием, превратившись из быстротекущего процесса в длительную хронически протекающую болезнь. Благодаря появлению новых фармакологических групп антиретровирусных препаратов и внедрению концепции высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) появилась возможность добиваться длительной супрессии репликации вируса, тем самым предотвращая дальнейшее прогрессирование инфекции [8]. Однако внедрение ВААРТ породило ряд проблем: токсичность препаратов в комбинированных схемах, необходимость их пожизненного приема, соблюдение высокой степени приверженности лечению, формирование резистентности вируса. При этом возникновение мутантных штаммов ВИЧ, резистентных к антиретровирусным препаратам (АРВП), является одной из основных причин неэффективности ВААРТ [4].

Учитывая современные тенденции развития мониторинга за течением ВИЧ-инфекции и постоянно увеличивающееся количество пациентов с большой давностью заболевания, особое внимание уделяется наблюдению за болезнью на поздних стадиях. Это позволяет устанавливать факторы, в том числе со стороны иммунной системы, влияющие на лечебно-диагностический процесс [1].

Несмотря на многочисленные исследования, механизмы повреждения иммунной системы при ВИЧ-инфекции по-прежнему до конца не ясны. Это относится и к случаям вирусологического и иммунологического неуспеха, поскольку формирование в организме больного вирусов с мутациями в геноме может иметь существенное значение при развитии иммунного ответа [6]. Связано это с тем, что изменения биологических свойств вируса, таких как фитнес, значимы для адаптации вирусной популяции и позволяют нейтрализовать противовирусную активность организма.

Феномен масштабных изменений в синтезе цитокинов иммунокомпетентными клетками при ВИЧ-инфекции получил название «цитокиновый шторм» [3]. Этот термин отражает ответ иммунной системы на внедрение и дальнейшую репликацию ВИЧ-1 и по сути своей описывает высокую степень рассогласованности в цитокиновой регуляции, в которую вмешивается инфекционный агент. Проникновение вируса в лимфоидную ткань вызывает иммунный ответ, включающий в себя в том числе синтез и продукцию цитокинов. Локальное поддержание значительных концентраций некоторых из них, а также снижение концентраций ряда других цитокинов, активирует экспрессию ВИЧ, находящегося в интегрированном состоянии в инфицированных клетках. Оппортунистические инфекции способствуют прогрессированию за-

болевания за счет дополнительной стимуляции иммунитета и влияния тем самым на синтез цитокинов. Комплекс цитокиновых эффектов даже при относительной иммунологической стабильности способствует поддержанию постоянного уровня экспрессии вируса, в том числе и на бессимптомной стадии инфекции [16].

Интерлейкин-2 (IL-2) является хорошо изученным цитокином-гемопоэтином, участвующим в процессах регуляции врожденного и адаптивного иммунитета. Основными продуцентами эндогенного IL-2 являются активированные Th1 CD4⁺-лимфоциты (90%) и CD8⁺-лимфоциты (10%), а также Т-клетки некоторых других субпопуляций лимфоцитов [14]. Основная иммунологическая функция IL-2 состоит в регуляции специфического (антигензависимого) иммунного ответа путем стимуляции пролиферации и дифференцировки иммунных клеток, участвующих в его реализации. Функционально IL-2 относится к группе провоспалительных цитокинов. IL-2 стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных Т-лимфоцитов в эффекторные Th-лимфоциты или цитотоксические Т-клетки, может стимулировать крупные гранулярные лимфоциты, макрофаги и В-клетки [9]. Согласно некоторым литературным данным на фоне ВИЧ-инфекции уровень эндогенного IL-2 постоянно снижается, вследствие чего нарушается регуляция иммунитета, пролиферация и дифференцировка наиболее важных иммунокомпетентных клеток [7].

В доступной отечественной и зарубежной литературе отсутствуют данные об изменениях уровней IL-2 при формировании устойчивости ВИЧ-1 к лекарственным препаратам. Таким образом, целью нашего исследования явилось выявление закономерностей изменения уровней IL-2 у ВИЧ-инфицированных пациентов на фоне сформированной лекарственной резистентности на поздних стадиях инфекции.

Материалы и методы

Под наблюдением находились пациенты (83 человек), проживающие на территории Приморского края и наблюдающиеся в Центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями ГБУЗ ККБ № 2 в 2013–2017 гг. Возраст пациентов составил 40,0±6,5 лет. Распределение по полу было равноценным; так, количество мужчин составило 44 человека (53%), а женщин — 39 (47%).

В зависимости от эффективности ВААРТ, были сформированы 4 группы пациентов. Группу пациентов с вирусологическим успехом ВААРТ, у которых уровень вирусной нагрузки (ВН ВИЧ) был недетектируемым, составили 30 человек (I группа). Вторую группу составили 53 человека с вирусологическим неуспехом ВААРТ, которым было проведено исследование

лекарственной устойчивости. По результатам секвенирования генома ВИЧ-инфицированные пациенты II группы были разделены на 2 подгруппы — с выявленной лекарственной резистентностью (31 человек, 58,5%) и отсутствием детектируемых мутаций резистентности в геноме (22 человека, 41,5%). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови.

Проводился клинико-лабораторный мониторинг эффективности ВААРТ с учетом приверженности к терапии. Уровни приверженности терапии оценивались анкетированием пациентов, которым было предложено ответить на вопросы о частоте и полноте приема лекарственных препаратов, наличии перерывов в приеме и соблюдении режимов питания. Стадии ВИЧ-инфекции устанавливались в соответствии с Российской классификацией ВИЧ-инфекции [5]. Лабораторные тесты контроля эффективности ВААРТ включали иммунологические (CD4⁺ Т-лимфоциты) и вирусологические (вирусная нагрузка ВИЧ) критерии оценки. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили с помощью одноплатформенной технологии методом проточной цитофлюориметрии с использованием прибора BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США), оснащенного двумя диодными лазерами 488 и 635 нм. Для окрашивания лимфоцитов использовали меченые флюорохромами моноклональные антитела BD Tritest CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP (Becton Dickinson, США). Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Определение вирусной нагрузки ВИЧ проводили с использованием системы автоматизированной пробоподготовки m2000sp и анализатора m2000rt методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, а также реагентов Abbott RealTime HIV-1 (Abbott, США).

Показанием к исследованию мутаций резистентности послужила вирусологическая неэффективность проводимого лечения. Материалом для проведения молекулярно-генетических исследований послужила плазма крови, взятая в период проведения терапии. Для выделения нуклеиновых кислот, проведения реакции обратной транскрипции, ПЦР, реакции циклического секвенирования была использована тест-система ViroSeq «HIV-1 Genotyping System» v 2.0 (Celera Diagnostics, Abbott, США), согласно инструкции производителя. Исследованию был подвергнут ген, кодирующий протеазу ВИЧ (1–99 кодоны) и две трети гена, кодирующего обратную транскриптазу (1–335 кодоны). Очистку продуктов секвенирования проводили с помощью комплекта реагентов BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США). Для проведения автоматического определения последовательностей методом капиллярного электрофореза

использован генетический анализатор AB 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ полученных хроматограмм сиквенсов проводился с использованием компьютерной программы «Sequencing Analysis» v 5.4. Для выявления и анализа мутаций лекарственной резистентности ВИЧ использованы программы «ViroSeq» v 2.8 и «SeqScape» v 2.7. Полученные консенсусные последовательности сравнивались с референсными с помощью базы данных Стенфордского университета, находящейся в свободном доступе (<http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput>).

В сыворотке крови обследованных больных и в группе контроля (доноры) уровни IL-2 определяли с использованием тест-системы «RayBiotech» (США) методом твердофазного сэндвич-ИФА, согласно прилагаемой инструкции. Учет результатов проводили с помощью планшетного спектрофотометра «Stat Fax 2100» (Awareness Technology, США). Расчет количественных параметров проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Концентрацию цитокинов выражали в пикограммах на миллилитр (пг/мл). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна–Уитни, коэффициента корреляции Спирмена и программы SPSS 22.

Результаты

При анализе амбулаторных карт пациентов было выявлено, что давность установления диагноза ВИЧ-инфекции варьировала от 5 месяцев до 14 лет. Анализ эпидемиологического анамнеза позволил установить, что большинство пациентов были инфицированы ВИЧ половым путем — 52 человека (62,7%). Треть пациентов указывали на факт внутривенного употребления наркотиков в течение длительного времени — 31 пациент (37,4%). Все пациенты на момент проведения исследования имели 4 стадию ВИЧ-инфекции.

Длительность проведения ВААРТ значительно варьирует: от 4 месяцев до 8 лет. Наибольшее количество обследованных пациентов получали терапию в течение трех лет.

В группу обследования вошли пациенты с различным количеством ранее назначенных схем терапии. Так, за весь период наблюдения были назначены по 2 и 3 схемы двум группам пациентов — по 32% пациентов каждая соответственно. Только 7,6% обследованных пациентов было назначено максимальное количество схем

ВААРТ — пять схем — на протяжении лечения, при этом трое из четырех пациентов этой группы умерли в период наблюдения. Одну схему ВААРТ получали 20,8% пациентов.

Среди схем ВААРТ первого ряда соотношение назначенных схем, содержащих 2 НИОТ+ННИОТ и 2 НИОТ+ИП, было примерно одинаковым — 53 и 47% соответственно. Среди схем первой группы чаще всего назначалась следующая схема: ламивудин + зидовудин + эфавиренц (82%); среди схем второй группы преобладали ламивудин + зидовудин + лопинавир бустированный (67%). При последующих сменах схем ВААРТ предпочтение отдавалось схемам, содержащим бустированные ИП — лопинавир, дарунавир.

При оценке уровня приверженности к проводимой терапии было установлено, что у большей части больных из группы со сформировавшейся лекарственной резистентностью, а именно у 32 человек (60,4%), наблюдалась приверженность низкого уровня, у 18 пациентов (34,0%) — среднего. По результатам тестирования при проведении консультирования психологом только у 1 пациента уровень приверженности был оценен как 100%, а еще у 2 пациентов — как 98%. На факт самостоятельного прерывания назначенной терапии на различные промежутки времени указали 40 больных (66%).

В таблице 1 представлены данные о совокупной встречаемости резистентности ВИЧ-1 у обследованных больных к препаратам трех групп. Наиболее часто обнаруживалась резистентность одновременно к препаратам групп НИОТ и ННИОТ (26%). Резистентность к препаратам лишь одной группы встречалась реже: к НИОТ — 6%, к ННИОТ — 12%. Выявлен лишь один случай развития резистентности к препаратам группы ИП. Одновременно резистентность к препаратам трех групп выявлена в 3 случаях (6%).

Вторичные мутации резистентности к ИП выявлены у трети больных, при этом только у трех пациентов отмечены основные мутации резистентности, приводящие к формированию лекарственной устойчивости (G48V, M46I, V82F). Среди наиболее часто встречающихся вторичных мутаций к ИП можно выделить A71V, L10I, L33I, L10V. У большей части обследованных пациентов чувствительность к препаратам этого класса сохранена.

Выявляется высокая степень резистентности к препаратам группы НИОТ — ламивудину и эмтрицитабину, в меньшей степени — к абакавиру

Таблица 1. Структура резистентности к препаратам ИП, НИОТ и ННИОТ

Table 1. Structure of drug resistance to HIV protease inhibitors (PIs), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)

ИП PIs	ИП+НИОТ PIs+NRTIs	ИП+НИОТ+ННИОТ PIs+NRTIs+NNRTIs	НИОТ NRTIs	ННИОТ NNRTIs	НИОТ+ННИОТ NRTIs+NNRTIs	Отсутствие резистентности Lack of drug resistance mutations
1 (1,9%)	3 (5,7%)	4 (7,5%)	3 (5,7%)	7 (13,2%)	13 (24,5%)	22 (41,5%)

Таблица 2. Сравнительная оценка уровней ВН ВИЧ (копий/мл) и CD4⁺ Т-лимфоцитов (кл/мкл) у пациентов I и II группTable 2. Comparative assessment of HIV viral load levels (copy/ml) and CD4⁺ T-cells (cells/mkl) in patients of groups I and II

Группы пациентов Patients groups	ВН ВИЧ, M±S HIV viral load levels	CD4 ⁺ Т-лимфоциты, M±S CD4 ⁺ T-cells	P
I группа (n = 30)/I group (n = 30)	0	419,4±94,6	p1I-p1II*** p2I-p2II**
II группа (n = 53)/II group (n = 53)	9230,6±3976,8	355,8±97,0	

Примечания. p1 — ВН ВИЧ; p2 — CD4⁺ Т-лимфоциты. Степень достоверности различий показателей между группами: **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.
Notes. p1 — HIV viral load levels; p2 — CD4⁺ T-cells. The degree of reliability of differences of indicators between groups: **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

и диданозину. Среди мутаций, обуславливающих резистентность к этому классу препаратов, наиболее часто встречается мутация M184V (39%). Также часто регистрировались мутации L74V (16,3%), D67N, K70R и Y115F (по 14,9% каждая). Среди препаратов группы ННИОТ резистентность высокой степени формируется чаще всего к эфавиренцу и невирапину (более трети всех обследованных пациентов). Наиболее часто резистентность обуславливали мутации K103N (13%), а также V106M, E138A и Y181C (по 6,6% каждая).

У ВИЧ-инфицированных пациентов были оценены уровни ВН ВИЧ и CD4⁺ Т-лимфоцитов (табл. 2). Были изучены уровни IL-2 в группах пациентов в зависимости от характера ответа на ВААРТ и выявления лекарственной резистентности (табл. 3). Для изучения степени сопряженности между изучаемыми признаками был проведен расчет значений коэффициента корреляции Спирмена (табл. 4).

Обсуждение

Естественное течение ВИЧ-инфекции характеризуется стадийностью, широким диапазоном уровней CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧ даже у пациентов одной стадии, а также изменением данных показателей со временем, что выявляется при динамическом наблюдении за пациентами. Коррективы вносит и назначение ВААРТ, поэтому у пациентов с вирусологически и иммунологически успешной терапией уровни CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧ значительно отличаются от таковых у пациентов-неответчиков. Этим обусловлено разделение пациентов, принявших участие в нашем исследовании, на группы с учетом указанных показателей. Так, отмечена статистически достоверная разница уровней ВН ВИЧ между двумя группами пациентов (0 копий/мл, то есть недетектируемый уровень, у па-

циентов I группы против 9230,6±3976,8 копий/мл у пациентов II группы, p ≤ 0,001). Уровни CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов обеих групп также достоверно различались (419,4±94,6 кл/мкл у пациентов I группы против 355,8±97,0 кл/мкл у пациентов II группы, p ≤ 0,01).

Процессы, ведущие к развитию иммунодефицита при ВИЧ-инфекции, являются чрезвычайно сложными и до конца не ясными. Тот факт, что цитокины играют важную роль в регуляции внутриклеточных функций, подчеркивает возможность их участия в модулировании или усилении патогенеза ВИЧ. Цитокины могут влиять на соотношение клеточно-опосредованных и гуморальных иммунных реакций, влияющих на репликацию ВИЧ, выживаемость клеток и появление клинических симптомов у инфицированного человека [19].

При активации иммунных клеток во время антигенной стимуляции происходит усиление продукции цитокинов. Конечным результатом действия многих цитокинов является та или иная степень репликации вируса ВИЧ, которая зависит от баланса между стимулирующим и подавляющим действием цитокинов [10]. При запуске иммунного ответа под воздействием антигенов Т-лимфоциты переходят в активированное состояние, что сопровождается синтезом IL-2. При острой ВИЧ-инфекции многими исследователями было отмечено преходящее повышение уровней различных цитокинов, в том числе и IL-2 [11, 18, 20]. При прогрессировании заболевания снижается не только абсолютное количество Т-лимфоцитов — продуцентов IL-2, но и уровень лимфоцитов, экспрессирующих IL-2 рецептор, что, в свою очередь, приводит к отсутствию реактивности к IL-2 [13]. Известно, что утрата Т-лимфоцитами способности продуцировать IL-2 не связана с влиянием вирусных белков напрямую на синтез изучаемого цитокина; сни-

Таблица 3. Уровни IL-2 в сыворотке крови больных с ВИЧ-инфекцией (пг/мл)

Table 3. IL-2 plasma levels in HIV-infected patients (pg/ml)

Контрольная группа The control group (n = 20) M±SD	I группа I group (n = 30) M±SD	II группа II group (n = 53) M±SD	Пациенты с ЛУ Drug resistance patients (n = 31) M±SD	Пациенты без ЛУ Non-drug resistance patients (n = 22) M±SD
2,0±0,20	4,89±0,55***	1,83±0,29*	1,75±0,26***	1,95±0,29ns

Примечание. Степень достоверности различий показателей по сравнению с контрольной группой: ns p > 0,05; ***p ≤ 0,001; * p ≤ 0,05.
Note. The degree of reliability of differences of indicators in comparison with the control group: ns p > 0.05; ***p ≤ 0.001; * p ≤ 0.05.

Таблица 4. Значения коэффициента корреляции Спирмена и статистическая значимость коррелятивных связей между уровнями IL-2, CD4⁺ Т-лимфоцитов и ВН ВИЧTable 3. The values of the Spearman correlation coefficient and statistical significance of the correlative relationships between the IL-2 plasma levels, CD4⁺ T-cells and HIV viral load levels

Группы пациентов Patients groups	CD4 ⁺ Т-лимфоциты CD4 ⁺ T-cells	ВН ВИЧ HIV viral load levels
I группа/I group	$r_s = 0,927$; $p = 0,01$	
II группа/II group	$r_s = 0,741$; $p = 0,01$	$r_s = 0,698$; $p = 0,01$
II группа, ЛУ+/II group, patients with drug resistance	$r_s = 0,621$; $p = 0,01$	$r_s = 0,538$; $p = 0,01$
II группа, ЛУ-/II group, patients without drug resistance	$r_s = 0,946$; $p = 0,01$	$r_s = 0,812$; $p = 0,01$

жение концентрации IL-2 опосредовано интеграцией вирусного генома в непосредственной близости от регуляторных последовательностей гена IL-2, что приводит к подавлению его синтеза [3].

В нашем исследовании было показано, что в сыворотке крови пациентов с ВИЧ-инфекцией, достигших вирусологического и иммунологического успеха ВААРТ (I группа), по сравнению с контрольной группой, отмечалось увеличение уровня IL-2 ($4,89 \pm 0,55$ пг/мл против $2,0 \pm 0,20$ пг/мл, $p < 0,001$, U-критерий) (табл. 3). Уровень IL-2 в группе пациентов с ВИЧ-инфекцией с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне ВААРТ (II группа) статистически значимо снижен по сравнению с контрольной группой ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $2,0 \pm 0,20$ пг/мл, $p < 0,05$, U-критерий).

При сравнении уровней IL-2 между группами пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой на фоне ВААРТ (ВН+) с лекарственной устойчивостью и без нее были получены достоверные различия ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,95 \pm 0,29$ пг/мл соответственно, $p \leq 0,05$, U-критерий). Однако по отношению ко II группе в целом значимых различий отмечено не было — как в группе пациентов с выявленной лекарственной устойчивостью ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $1,83 \pm 0,29$ пг/мл, $p > 0,05$, U-критерий), так и в группе пациентов без ЛУ ($1,95 \pm 0,29$ пг/мл против $1,83 \pm 0,29$ пг/мл, $p > 0,05$, U-критерий).

При изучении содержания IL-2 в сыворотке крови с учетом выявленной лекарственной резистентности было показано, что его содержание статистически значимо ниже во II группе пациентов (не достигших успеха на фоне ВААРТ) в целом, чем в I группе ($1,83 \pm 0,29$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл соответственно, $p < 0,001$, U-критерий) (табл. 3). Наибольшее снижение уровней IL-2 выявлено у пациентов со сформированной лекарственной устойчивостью ($1,75 \pm 0,26$ пг/мл против $4,89 \pm 0,55$ пг/мл в I группе, $p < 0,001$, U-критерий).

Полученные коэффициенты корреляции Спирмена указывают на высокую тесноту связи уровней IL-2 и CD4⁺ Т-лимфоцитов у пациентов I группы, достигших ожидаемого ответа на ВААРТ ($r_s = 0,927$; $p = 0,01$), и у пациентов II группы без подтвержденной лекарственной устойчивости ВИЧ ($r_s = 0,946$; $p = 0,01$). При оценке тесноты связи между IL-2 и ВН ВИЧ высокий

коэффициент корреляции был получен только для пациентов II группы без ЛУ ($r_s = 0,812$; $p = 0,01$) (табл. 4).

Достижение эффективного ответа на ВААРТ характеризуется снижением репликативной активности вируса до минимального уровня и, как следствие, недетектируемой вирусной нагрузкой. В этих условиях формирование лекарственной резистентности ВИЧ не наблюдается. Антитретровирусная терапия способствует уменьшению пула быстро пролиферирующих клеток и восстановлению компартамента циркулирующих Т-лимфоцитов, в том числе за счет перераспределения циркулирующих клеток [17]. На фоне подавления репликации происходит восстановление популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов — их уровень у пациентов I группы составил $419,4 \pm 94,6$ кл/мкл. Уровень IL-2 у пациентов данной группы составил $4,89 \pm 0,55$ пг/мл, что превышает значения контрольной группы практически в 2 раза.

В исследовании [21] было показано, что у пациентов с авиремией, получавших терапию в течение 6 лет и более, обнаруживались две популяции CD4⁺ Т-клеток памяти, производящих IL-2: центральные клетки памяти CD45RA⁻CCR7⁺, производящие исключительно IL-2, и эффекторные клетки памяти CD45RA⁻CCR7⁻, которые продуцировали IL-2 и интерферон-гамма (IFN γ). У пациентов с виремией на фоне ВААРТ авторы обнаружили значительные доли эффекторных клеток памяти, которые производили исключительно IFN γ . В исследовании было продемонстрировано, что только клетки, обладающие способностью продуцировать IL-2, сохраняются как долговременные клетки памяти. Авторы установили, что при постоянной циркуляции вирусных антигенов быстро индуцируется дифференциация в клетки, производящие только IFN γ , которые не обладают способностью к самообновлению. Вероятно, выявленное нами увеличение уровней IL-2 является следствием формирования описанного клеточного репертуара. Дополнительным аргументом может быть выявление низких уровней IL-2 у пациентов, не достигших вирусологического успеха на фоне ВААРТ (ВН ВИЧ $9230,6 \pm 3976,8$ кл/мкл) — $1,83 \pm 0,29$ пг/мл.

Известно, что дефицит IL-2 нарастает с прогрессией ВИЧ-инфекции и совпадает со сни-

жением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов [12]. При этом нарушается их хелперная активность. Переключение CD4⁺ Т-лимфоцитов первого типа на второй тип сопровождается утратой клетками способности к синтезу не только IL-2, но и интерферона-альфа (IFN α), факторов, поддерживающих дифференцировку и активность другой разновидности иммунокомпетентных клеток — цитотоксических лимфоцитов [15].

У пациентов с выявленной лекарственной устойчивостью отмечались наиболее низкие уровни IL-2 среди пациентов с неэффективностью ВААРТ — 1,75±0,26 пг/мл. Известно, что в вирусном геноме мутации возникают под селективным давлением специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов [3]. Селекция различных генетических вариантов протекает при естественном течении ВИЧ-инфекции под влиянием, с одной стороны, организма хозяина (давление со стороны иммунной системы) и, с другой, жизнеспособности самого вируса, то есть его фитнеса [2]. Таким образом, формирование мутаций полиморфизма является взаимообусловленным процессом, отражающим особенности биологии ВИЧ. Неадекватный прием АРВП создает дополнительную возможность для репликации устойчивых к определенным препаратам вирусных вариантов в присутствии фармакологического вещества. В результате этого происходит селективный отбор преобладающих резистентных вариантов — индивидуальных у каждого пациента.

На поздних стадиях ВИЧ-инфекции наблюдается снижение активности цитотоксических лимфоцитов (CTL), одной из причин которого является утрата IL-2 как фактора дифференцировки лимфоцитов. Вероятно, что сдерживающее влияние CTL на репликацию ВИЧ ослабе-

вает, и это может способствовать накоплению мутаций полиморфизма и послужить дополнительным неблагоприятным фактором в формировании лекарственной резистентности ВИЧ.

Проведенное исследование показало, что в группе лиц, достигших вирусологического и иммунологического успеха ВААРТ, отмечается увеличение показателей IL-2, что может быть связано с восстановлением числа продуцирующих данный цитокин иммунных клеток (Т-лимфоцитов). Снижение уровней IL-2 у пациентов с сохраняющейся вирусной нагрузкой сопровождается прогрессированием заболевания. Максимальное падение уровней IL-2 среди обследованных больных у пациентов со сформированной лекарственной устойчивостью, вероятно, может свидетельствовать о длительно поддерживаемой благодаря мутациям лекарственной устойчивости репликации ВИЧ, что приводит к прогрессивному постепенному падению уровней Т-лимфоцитов (основных продуцентов IL-2).

Конечно, при ВИЧ-инфекции в процесс иммунопатогенеза вовлекаются все протективные механизмы, а со стороны вируса действуют многочисленные эволюционно выработанные факторы защиты. Иммунодепрессивное действие ВИЧ проявляется на различных уровнях организации макроорганизма с вовлечением в процесс сложных патогенетических механизмов. Ни один фактор иммунной системы, будь то клеточное звено, гуморальный ответ, спектр цитокинов либо дендритные клетки, не в состоянии самостоятельно противостоять разрушающему действию ВИЧ. Изучение непростых механизмов взаимодействия иммунной системы и ВИЧ является необходимым условием в создании новых способов лечения ВИЧ-инфекции.

Список литературы/References

1. Агошков А.А., Пшеничная Н.Ю., Айдамирова Х.А., Шевченко Т.А. Клинико-лабораторные и эпидемиологические аспекты ВИЧ-инфекции в «продвинутых» стадиях в Чеченской Республике // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 13, № 3. С. 70–71. [Agoshkov A.A., Pshenichnaya N.Y., Aidamirova H.A., Shevchenko T.A. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HIV-infection in the late stages in the Chechen Republic. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 70–71. (In Russ.)]
2. Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ. М.: Человек, 2014. 288 с. [Bobkova M.R. *Lekarstvennaya ustoichivost' VICH [HIV drug resistance]*. Moscow: Chelovek, 2014. 288 p.]
3. Вирус иммунодефицита человека — медицина. Под ред. Белякова Н.А., Рахмановой А.Г. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2010. 752 с. [Virus immunodefitsita cheloveka — meditsina. Pod red. Belyakova N.A., Rakhmanovoi A.G. [Human immunodeficiency virus — medicine. Eds. Belyakov N.A., Rakhmanova A.G.]. *St. Petersburg: Baltiiskii Meditsinskii Obrazovatel'nyi Tsentri*, 2010. 752 p.]
4. Гашникова Н.М., Богачев В.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Савочкина Е.Н., Черноусова Н.Я. Распространенность мутаций, ответственных за резистентность к антиретровирусным препаратам, среди вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 6. С. 56–60. [Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Mescheryakova Yu.V., Savochkina E.N., Chernousova N.Ya. Prevalence of mutations responsible for resistance to antiretroviral preparations among HIV-1 variants circulating in Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2012, no. 6, pp. 56–60. (In Russ.)]
5. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю., Ермак Т.Н., Буравцова Е.В., Шахгильдян В.И., Козырина Н.В., Нарсия Р.С., Зимина В.Н., Покровская А.В., Ефремова О.С. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014. № 6. С. 1–43. [Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu., Ermak T.N., Buravcova E.V., Shakhgildyan V.I., Kozirina N.V., Narsia R.S., Zimina V.N., Pokrovskaya A.V., Efremova O.S. Protocols dispensary observation and treatment of patients with HIV-infection. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2014, no. 6, pp. 1–43. (In Russ.)]

6. Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Показатели CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов пациентов, инфицированных вариантами вируса иммунодефицита человека 1-го типа подтипа А, несущими мутации V77I в протеазе и А62V в обратной транскриптазе // Вопросы вирусологии. 2010. № 2. С. 22–26. [Selimova L.M., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Nosik D.N. CD4+ and CD8+ T-lymphocyte counts in human immunodeficiency virus type 1 subtype A-infected patients carrying mutations V77I in protease and/or A62V in reverse transcriptase. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2010, no. 2, pp. 22–26. (In Russ.)]
7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13, № 3. С. 18–41. [Simbircev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2013, vol. 13, no. 3, pp. 18–41. (In Russ.)]
8. Хоффман К., Рокштро Ю.К. Лечение ВИЧ-инфекции. М.: Р. Валент, 2012. 736 с. [Hoffman K., Rockstroh Yu.K. Lechenie VICH-infekcii [Treatment of HIV infection]. Moscow: R. Valent, 2012, 736 p.]
9. Шипилов М.В. Интерлейкин-2 и острые респираторные вирусные инфекции // Известия Смоленского государственного университета. 2011. № 3. С. 294–299. [Shipilov M.V. Interleukin-2 and acute respiratory viral infections. *Izvestija Smolenskogo gosudarstvennogo universiteta = Smolensk State University News*, 2011, no. 3, pp. 294–299. (In Russ.)]
10. Armah K.A., McGinnis K., Baker J., Gibert C., Butt A.A., Bryant K.J., Goetz M., Tracy R., Oursler K.K., Rimland D., Crothers K., Rodriguez-Barradas M., Crystal S., Gordon A., Kraemer K., Brown S., Gerschenson M., Leaf D.A., Deeks S.G., Rinaldo C., Kuller L.H., Justice A., Freiberg M. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 55, no. 1, pp. 126–136. doi: 10.1093/cid/cis406
11. Bebell L.M., Passmore J.A., Williamson C., Mlisana K., Iriogbe I., van Loggerenberg F., Karim Q.A., Karim S.A. Relationship between levels of inflammatory cytokines in the genital tract and CD4+ cell counts in women with acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.*, 2008, vol. 198, iss. 5, pp. 710–714. doi: 10.1086/590503
12. Cellerai C., Harari A., Stauss H., Yerly S., Geretti A.M., Carroll A., Yee T., Ainsworth J., Williams I., Sweeney J., Freedman A., Johnson M., Pantaleo G., Kinloch-de Loes S. Early and prolonged antiretroviral therapy is associated with an HIV-1-specific T-cell profile comparable to that of long-term non-progressors. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, iss. 4: e18164. doi: 10.1371/journal.pone.0018164
13. David D., Keller H., Naït-Ighil L., Treilhou M.P., Joussemet M., Dupont B., Gachot B., Maral J., Thèze J. Involvement of Bcl-2 and IL-2R in HIV-positive patients whose CD4 cell counts fail to increase rapidly with highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 2002, vol. 16, no. 8, pp. 1093–1101.
14. Gaffen S.L., Liu K.D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, 2004, vol. 28, no. 3, pp. 109–123. doi: 10.1016/j.cyto.2004.06.010
15. Gamberg J., Barrett L., Bowmer M.I., Howley C., Grant M. Factors related to loss of HIV-specific cytotoxic T lymphocyte activity. *AIDS*, 2004, vol. 18, no. 4, pp. 597–604.
16. Haas A., Zimmermann K., Oxenius A. Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 23, pp. 12102–12103. doi: 10.1128/JVI.05607-11
17. Mohri H., Perelson A.S., Tung K., Ribeiro R.M., Ramratnam B., Markowitz M., Kost R., Weinberger L., Cesar D., Hellerstein M.K., Ho D.D. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, no. 9, pp. 1277–1287. doi: 10.1084/jem.194.9.1277
18. Norris P.J., Pappalardo B.L., Custer B., Spotts G., Hecht F.M., Busch M.P. Elevations in IL-10, TNF- α and IFN- γ from the earliest point of HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, 2006, vol. 22, no. 8, pp. 757–762. doi: 10.1089/aid.2006.22.757
19. Ostrowski S.R., Gerstoft J., Pedersen B.K., Ullum H. Impaired production of cytokines is an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 2003, vol. 17, no. 4, pp. 521–530. doi: 10.1097/01.aids.0000050813.06065.ed
20. Stacey A.R., Norris P.J., Qin L., Haygreen E.A., Taylor E., Heitman J., Lebedeva M., DeCamp A., Li D., Grove D., Self S.G., Borrow P. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viraemia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, no. 8, pp. 3719–3733. doi: 10.1128/JVI.01844-08
21. Younes S.A., Yassine-Diab B., Dumont A.R., Boulassel M.R., Grossman Z., Routy J.P., Sekaly R.P. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 198, no. 12, pp. 1909–1922. doi: 10.1084/jem.20031598

Авторы:

Елисеева В.С., врач клинической лабораторной диагностики клинико-иммунологической лаборатории, ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Кругляк С.П., к.м.н., зав. клинико-иммунологической лабораторией, ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Скляр Л.Ф., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия; зам. главного врача ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2», Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, г. Владивосток, Россия;

Маркелова Е.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия;

Боровская Н.А., к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО ТГМУ МЗ РФ, г. Владивосток, Россия.

Authors:

Eliseeva V.S., Doctor of Laboratory Diagnostics, Clinical and Immunological Laboratory, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Kruglak S.P., PhD (Medicine), Head of the Clinical and Immunological Laboratory, Regional Clinical Hospital No. 2, Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Sklar L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation; Deputy Chief Doctor of the Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Vladivostok, Russian Federation;

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation;

Borovskaya N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.08.2017
Отправлена на доработку 02.03.2018
Принята к печати 27.04.2018

Received 16.08.2017
Revision received 02.03.2018
Accepted 27.04.2018

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

В.В. Зарубаев¹, С.В. Васильева², Я.Л. Есаулкова³, А.В. Гаршинина¹,
В.М. Вепринцева⁴, А.В. Галочкина¹, Е.С. Процак⁵, И.В. Теселкин⁶,
А.С. Морковник⁷, Л.Н. Диваева⁷, И.Н. Лаврентьева¹

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

² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургская ветеринарная академия, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁶ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия

⁷ Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Грипп является острой респираторной вирусной инфекцией, представляющей важную проблему для здравоохранения. Ежегодно грипп вызывает эпидемии, приводящие к повышению заболеваемости и смертности во всех регионах земного шара. Благодаря сегментарной организации генома и низкой точности его репликации вирус гриппа способен к ускользанию от иммунного ответа хозяина (антигенный дрейф), а также к селекции лекарственно-устойчивых вариантов. Это вызывает необходимость постоянного мониторинга за чувствительностью вирусных изолятов к противовирусным препаратам и разработке новых этиотропных противовирусных средств, имеющих альтернативные мишени и механизмы активности. Целью настоящего исследования была характеристика новых производных аминобензимидазола как протективных средств при летальной гриппозной инфекции у белых мышей. Эффективность соединений была оценена по их способности снижать специфическую смертность животных в ходе летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), повышать продолжительность жизни животных, а также нормализовать морфологическую структуру ткани легких по сравнению с группой плацебо. Для всех изученных соединений было показано снижение специфической смертности животных (от 20 до 60%). При этом препарат сравнения (осельтамивир фосфат) снижал смертность мышей на 80%. Наибольшие показатели протективной активности имело производное бензимидазола 2519, применение которого снижало гибель животных на 60% и повышало среднюю продолжительность их жизни на 1,6 сут по сравнению с контрольной группой. Морфологический анализ показал, что активность производного 2519 проявлялась в нормализации морфологической структуры ткани легких в ходе

Адрес для переписки:

Зарубаев Владимир Викторович
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (911) 928-04-95
Факс: 8 (812) 233-20-92
E-mail: zarubaev@gmail.com

Contacts:

Vladimir V. Zarubaev
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (911) 928-04-95
Fax: +7 (812) 233-20-92
E-mail: zarubaev@gmail.com

Библиографическое описание:

Зарубаев В.В., Васильева С.В., Есаулкова Я.Л., Гаршинина А.В.,
Вепринцева В.М., Галочкина А.В., Процак Е.С., Теселкин И.В.,
Морковник А.С., Диваева Л.Н., Лаврентьева И.Н. Протективная
активность новых производных бензимидазола при
экспериментальной гриппозной инфекции // Инфекция и иммунитет.
2018. Т. 8, № 2. С. 195–200. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-195-200

Citation:

Zarubaev V.V., Vasilieva S.V., Esaulkova Y.L., Garshinina A.V., Vepprintseva V.M.,
Galochkina A.V., Protsak Y.S., Teselkin I.V., Morkovnik A.S., Divaeva L.N.,
Lavrentieva I.N. Protective activity of novel benzimidazole derivatives
at experimental influenza infection // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 195–200.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-195-200

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 17-44-07003).

гриппозной пневмонии. На 5 сут после инфицирования клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными, в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь. При этом корреляция между ранее полученными данными о вирусингибирующем действии этих соединений *in vitro* и данными, полученными на животных, отсутствовала. Это позволяет говорить о том, что несмотря на наличие прямой противовирусной активности, выявляемой в опытах *in vitro*, протективные свойства изученных аминобензимидазолов на животных обусловлены, помимо этиотропного эффекта, другими, патогенетическими, факторами. Таким образом, аминопроизводные бензимидазола следует рассматривать как соединения, перспективные для дальнейшей разработки и внедрения в качестве противогриппозных средств.

Ключевые слова: грипп, гриппозная инфекция, химиотерапия, производные бензимидазола, противовирусные средства, активность *in vivo*.

PROTECTIVE ACTIVITY OF NOVEL BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES AT EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION

Zarubaev V.V.^a, Vasilieva S.V.^b, Esaulkova Y.L.^c, Garshinina A.V.^a, Veprintseva V.M.^d, Galochkina A.V.^a, Protsak Y.S.^e, Teselkin I.V.^f, Morkovnik A.S.^g, Divaeva L.N.^g, Lavrentieva I.N.^a

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

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS (Siberian Branch), Novosibirsk, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^d St. Petersburg Veterinary Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^e 1st St. Petersburg Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^f St. Petersburg Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation

^g Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Influenza is an acute respiratory viral infection, which represents an important health problem. Every year, influenza causes epidemics and pandemics, leading to increase in morbidity and mortality in all regions of the globe. Due to the segmental organization of the genome and low accuracy of its replication, the influenza virus is capable of escaping the host's immune response (antigenic drift), as well as the selection of drug-resistant variants. This calls for constant monitoring of the sensitivity of viral isolates to antiviral drugs and the development of new etiotropic antiviral agents that have alternative targets and mechanisms of activity. The purpose of this study was to characterize the new aminobenzimidazole derivatives as protective agents in lethal influenza infection in white mice. The efficacy of the compounds was assessed by their ability to reduce specific mortality of animals in the course of lethal influenza pneumonia caused by the influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus, increase the life duration of animals, and normalize the morphological structure of lung tissue comparing to the placebo group. For all the compounds studied, a decrease in the specific mortality of animals (from 20 to 60%) has been shown. The reference drug (oseltamivir phosphate) reduced the mortality of mice by 80%. The benzimidazole derivative 2519 demonstrated the highest indices of protective activity, its use reduced the mortality of animals by 60% and increased their mean day of death by 1.6 days in comparison with the control group. Morphological analysis showed that the activity of derivative 2519 was manifested in the normalization of the morphological structure of lung tissue in the course of influenza pneumonia. On day 5 after infection, the cells of the bronchial epithelium looked intact, in contrast to destroyed cells with numerous viral inclusions in control animals. The foci of inflammation themselves occupied a smaller area compared to the control. At the same time, there was no correlation between the previously obtained data on the virus-inhibiting effect of these compounds *in vitro* and the data obtained in animals. This suggests that despite the presence of direct antiviral activity detected previously in *in vitro* experiments, the protective properties of the studied aminobenzimidazoles on animals are caused, in addition to the etiotropic effect, by other pathogenetic factors. In conclusion, amino derivatives of benzimidazole should be considered as compounds that are promising for further development and introduction as an anti-influenza agents.

Key words: influenza, influenza infection, chemotherapy, benzimidazole derivatives, antivirals, activity *in vivo*.

Введение

Грипп является острой респираторной вирусной инфекцией, представляющей важную проблему для здравоохранения. Ежегодно грипп вызывает эпидемии, приводящие к повышению заболеваемости и смертности во всех регионах земного шара [6]. Благодаря специфической организации генома и низкой точности его репликации вирус гриппа способен к ускольза-

нию от иммунного ответа хозяина (антигенный дрейф), а также к селекции лекарственно-устойчивых вариантов. Это вызывает необходимость постоянного мониторинга за антигенными свойствами циркулирующих штаммов и обновления штаммового состава вакцин. Кроме того, важной составной частью системы мониторинга за гриппом является контроль чувствительности вирусных изолятов к противовирусным препаратам [17].

Для профилактики и лечения гриппа применяются противовирусные препараты четырех групп. Производные адамантана — амантадин и ремантадин — блокируют активность вирусного протонного канала М2 [4, 15]. Ингибиторы нейраминидазы — зарегистрированные в России осельтамивир (Тамифлю) и занамивир (Реленца), а также используемые в США и Японии перамивир (Рапиваб) и ланинамивир (Инавир), угнетают активность вирусного фермента нейраминидазы, блокируя тем самым процесс почкования вирионов потомства от плазматической мембраны [8]. Ингибиторы вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы рибавирин и фавипиравир (Т-705) индуцируют летальный мутагенез при транскрипции и репликации вирусного генома, приводя к формированию неинфекционного вирусного потомства [12]. Арбидол (умифеновир) ингибирует фузогенную активность вирусного гемагглютинаина, препятствуя латеральной диффузии его молекул, сборке фузогенного комплекса и слиянию вирусной и клеточной мембран [13].

Несмотря на большое количество вирусных компонентов, используемых в качестве мишеней для химиотерапии, каждая из групп препаратов имеет свои недостатки. Так, амантадин и ремантадин утратили свою фармакологическую актуальность, во-первых, из-за широкого распространения в человеческой популяции вируса гриппа В, против которого эти препараты исходно неактивны, а кроме того из-за повсеместного распространения лекарственно-устойчивых вариантов вируса [1, 7]. То же можно сказать об ингибиторах нейраминидазы. За период 2007–2009 гг. в пределах подтипа H1N1 было отмечено нарастание доли осельтамивир-устойчивых штаммов вируса гриппа, что привело к 100% резистентности во всех регионах земного шара [14]. Рибавирин, вследствие большого количества побочных эффектов, применяется лишь по жизненным показаниям, а также при терапии РС-вирусной инфекции у новорожденных и в комбинации с интерфероном — при лечении гепатита С [16].

Таким образом, разработка эффективных и доступных средств терапии гриппа, использующих альтернативные мишени и имеющих иные по сравнению с описанными механизмы активности, является актуальной задачей медицинской науки. Ранее нами был продемонстрирован противогриппозный потенциал новых химических соединений группы аминобензимидазолов [18]. Целью настоящего исследования была характеристика противовирусной активности соединений этой группы в опытах *in vivo*.

Материалы и методы

Препараты. В работе использовали соединения группы аминобензимидазолов, синтезированные в Южном федеральном университете. Строение полученных соединений было подтверждено при помощи масс-спектрометрии



Рисунок 1. Структура производных бензимидазола, использованных в исследовании

Figure 1. Structure of benzimidazole derivatives used in the study

(рис. 1). В экспериментах использовали образцы с чистотой не менее 95%. Вещества растворяли в смеси Твин-80 — вода (1:50), после чего из полученного раствора готовили необходимые разведения на среде MEM для экспериментов на животных. В качестве референс-препарата использовали Тамифлю (осельтамивира фосфат, LaRoche, Швейцария).

Вирусы. В работе был использован адаптированный к мышам вирус гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09. Вирус пассировали в аллантоисной полости 10–12 дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36°C.

Животные. Белых беспородных мышей (самки) массой 12–16 г получали из питомника «Рапполово» (Ленинградская область) и содержали на стандартном рационе с неограниченным доступом к пище и воде. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 1 неделю.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Для заражения животных была использована вирусосодержащая аллантоисная жидкость куриных эмбрионов. Исследуемые препараты вводили животным перорально через желудочный зонд в дозе 50 мг/кг и объеме 0,2 мл 1 р/сут в течение 5 дней, начиная с 1-х суток после инфицирования животных. В качестве препарата сравнения использовали Тамифлю, который вводили по той же схеме, что и изучаемые препараты, в дозе 20 мг/кг/сут. В качестве плацебо контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 10^4 TCID₅₀ на мыш. Наблюдение за животными осуществляли на протяжении 14 дней, то есть срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе рассчитывали процент смертности (М, отношение числа павших за 14 дней животных

Таблица. Протективная активность производных бензимидазола при экспериментальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09

Table. Protective activity of benzimidazole derivatives on influenza infection caused by A/California/7/09 (H1N1)pdm09 virus

Соединение Compound	Показатель селективности Selectivity index <i>in vitro</i> [18]	Смертность, % Mortality, %	Индекс защиты, % Index of protection, %	Средняя продолжительность жизни, сут. Mean day of death
2519	8	40,0	60,0	8,8
2520	83	60,0	40,0	7,2
2521	9	70,0	30,0	7,6
2522	8	60,0	40,0	7,5
2523	28	60,0	40,0	7,7
2524	23	80,0	20,0	7,5
Тамифлю/ Tamiflu	780	20,0	80,0	7,0
Плацебо/ Placebo	–	100,0	–	7,2

к общему числу зараженных животных в группе), индекс защиты (ИЗ, отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе) и среднюю продолжительность жизни животных (СПЖ) из расчета 14 дней наблюдения в соответствии со следующими формулами:

$$\text{СПЖ} = (\sum N D) / N_t,$$

где N — количество животных, проживших D дней, N_t — общее число животных в группе;

$$M = M / N_t,$$

где M — число животных в группе, павших в течение 14 дней после заражения;

$$\text{ИЗ} = ((M_c - M_e) / M_c) \times 100\%,$$

где M_c и M_e — смертность в процентах в контрольной и опытной группах соответственно.

В отдельной серии экспериментов изучали влияние соединения 2519 на морфогенез гриппозной инфекции в легких. Для этого животных заражали вирусом в дозе 500 TCID₅₀ на мышь и вводили соединение 2519 или плацебо, как описано выше. На 5 день после заражения 5 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие для гистологического анализа.

Гистологический анализ. Для морфологического исследования легкие фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезжировали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через две смены ксилола и заключали в бальзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах пневмо-

нии, а также степень дегенеративных и пролиферативных процессов в ткани легких.

Статистический анализ данных. Достоверность различий в выживаемости животных проводили при помощи анализа кривых выживаемости Каплана–Мейера по методу Манта–Хантла–Кокса пакета программ Statistica 8.0. Достоверными считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05.

Результаты

В опытах по изучению протективной активности производных бензимидазола *in vivo* были использованы соединения, ранее продемонстрировавшие вирусингибирующие свойства в опытах *in vitro* [18]. Как было показано в ходе экспериментов, инфицирование животных адаптированным вирусом гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09 приводило к развитию патологического процесса, сопровождающегося смертностью животных начиная с 6 дня после заражения. К 9 сут после инфицирования смертность животных составила 100%. Применение препарата сравнения осельтамивира фосфата (Тамифлю) снижало смертность животных на 80%, что говорит об активности этого препарата против модельного вируса.

Применение изучаемых соединений влияло на динамику гибели животных в разной степени. Для всех изученных соединений было показано снижение специфической смертности животных, а для соединения 2519 — увеличение средней продолжительности жизни на 1,6 сут по сравнению с контрольной группой. Производное бензимидазола 2519 имело наибольшие показатели протективной активности (индекс защиты 60%).

Данные экспериментов о влиянии производных бензимидазола на динамику гибели животных суммированы в таблице и для наглядности представлены на рисунке 2 (III обложка).

Полученные данные были подтверждены при помощи морфологического анализа ткани легких животных. У зараженных животных, не получавших лечения, морфологические изменения

легочной ткани на 5 сут после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха, интенсивного серозного интерстициального отека, очагов геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширением сосудов и спадением альвеол (рис. 3А, III обложка). Значительная часть нейтрофилов при этом находилась в стадии распада. Перечисленные явления типичны для интенсивно протекающей вирусной пневмонии, и степень их выраженности может служить критерием для оценки тяжести процесса.

При использовании соединения 2519 отличия морфологической структуры легких животных, прошедших лечение, от контрольной группы заключались в резком ограничении признаков вирусспецифического поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии. Так, на 5 сут после инфицирования клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными, в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь (рис. 3Б, III обложка). Таким образом, активность бензимидазольного производного 2519 проявлялась в нормализации морфологической структуры ткани легких в ходе гриппозной пневмонии.

Обсуждение

Опасность гриппозной инфекции, способность вируса гриппа к формированию лекарственно-устойчивых штаммов, приводящая к снижению эффективности этиотропной противовирусной терапии, диктует необходимость поиска и разработки новых препаратов, обладающих возможно более высокой эффективностью и широким спектром противовирусного действия. Ранее нами были продемонстрированы вирусингибирующие свойства новых производных аминокбензимидазолов [18]. В настоящем исследовании представлены данные о противогриппозной активности соединений этой группы в опытах *in vivo*.

Сопоставляя данные об активности производных *in vivo* и *in vitro*, можно видеть, что корреляция между индексом селективности на клетках и про-

теktivной активностью в опытах на животных отсутствует. Так, наиболее активное производное 2520 (SI = 83) в опытах на животных проявляло умеренные защитные свойства (ИЗ = 40), тогда как максимальная протективная активность была обнаружена у наименее активного, по данным *in vitro*, соединения 2519 (SI = 8). В то же время соединение 2522, так же, как и 2519, не имеющее активности в клеточной культуре, и на животной модели проявляло умеренную активность (ИЗ = 40%). Из этого можно заключить, что несмотря на наличие прямой противовирусной активности, выявляемой в опытах *in vitro*, протективные свойства бензимидазолов на животных обусловлены, помимо этиотропного эффекта, другими, патогенетическими, факторами.

Производные бензимидазола используются в фармакологии в течение длительного времени, и за это время для многих из них была показана биологическая активность самой разной природы. Так, эти соединения проявляли противовоспалительные, противомикробные, анальгезирующие, противотуберкулезные свойства, а также обладали противораковой, противовирусной, антипротозойной, диуретической, антипаразитарной и антигипертензивной активностью [9]. Прямая противовирусная активность бензимидазолов была продемонстрирована в отношении вируса герпеса [10], респираторно-синцитиального вируса [5] и др. [2]. Ни одно из соединений этой группы, однако, не было зарегистрировано как противовирусное средство [2]. При этом все большее количество исследований свидетельствует о способности бензимидазолов проявлять протективную активность при острых состояниях за счет их активности как антагонистов рецепторов, обеспечивающих реакции врожденного иммунитета. Так, была показана активность бензимидазольного производного 1g как агониста TLR8 [3], а для некоторых других соединений этой группы — способность ингибировать передачу сигнала Jak-1 [11]. Таким образом, выявленная в ходе опытов протективная активность может быть обусловлена как непосредственно вирусингибирующими свойствами производных бензимидазола, так и опосредованными патогенетическими механизмами. Помимо этого, разные соединения могут обладать разной биодоступностью, что тоже будет вносить вклад в суммарные показатели защиты при гриппозной инфекции. Для детального изучения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Список литературы/References

1. Abed Y., Goyette N., Boivin G. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 2, pp. 556–559. doi: 10.1128/AAC.49.2.556-559.2005
2. Akhtar W., Khan M.F., Verma G., Shaquiquzzaman M., Rizvi M.A., Mehdi S.H., Akhter M., Alam M.M. Therapeutic evolution of benzimidazole derivatives in the last quinquennial period. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, vol. 126, pp. 705–753. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.010
3. Beesu M., Caruso G., Salyer A.C., Shukla N.M., Khetani K.K., Smith L.J., Fox L.M., Tanji H., Ohto U., Shimizu T., David S.A. Identification of a human toll-like receptor (TLR) 8-specific agonist and a functional pan-TLR inhibitor in 2-aminoimidazoles. *J. Med. Chem.*, 2016, vol. 59, no. 7, pp. 3311–3330. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00023

4. Cady S.D., Schmidt-Rohr K., Wang J., Soto C.S., Degrado W.F., Hong M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 2010, vol. 463, pp. 689–692. doi: 10.1038/nature08722
5. Cichero E., Tonelli M., Novelli F., Tasso B., Delogu I., Loddo R., Bruno O., Fossa P. Benzimidazole-based derivatives as privileged scaffold developed for the treatment of the RSV infection: a computational study exploring the potency and cytotoxicity profiles. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2017, vol. 32, no. 1, pp. 375–402. doi: 10.1080/14756366.2016.1256881
6. Fiore A.E., Shay D.K., Broder K., Iskander J.K., Uyeki T.M., Mootrey G., Bresee J.S., Cox N.J. Prevention and control of influenza recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm. Rep.*, 2008, vol. 57, pp. 1–60.
7. Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.*, 2014, vol. 8, pp. 22–29. doi: 10.1016/j.coviro.2014.04.009
8. Ikematsu H., Kawai N., Iwaki N., Kashiwagi S. In vitro neuraminidase inhibitory activity of four neuraminidase inhibitors against clinical isolates of the influenza virus circulating in the Japanese 2013–2014 season. *J. Infect. Chemother.*, 2015, vol. 21, iss. 9, pp. 634–638. doi: 10.1016/j.jiac.2015.05.004
9. Keri R.S., Hiremathad A., Budagumpi S., Nagaraja B.M. Comprehensive review in current developments of benzimidazole-based medicinal chemistry. *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, vol. 86, iss. 1, pp. 19–65. doi: 10.1111/cbdd.12462
10. Kharitonova M.I., Denisova A.O., Andronova V.L., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Kotovskaya S.K., Galegov G.A., Charushin V.N., Miroshnikov A.I. New modified 2-aminobenzimidazole nucleosides: Synthesis and evaluation of their activity against herpes simplex virus type 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, vol. 27, iss. 11, pp. 2484–2487. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.100
11. Kim M.K., Shin H., Park K.S., Kim H., Park J., Kim K., Nam J., Choo H., Chong Y. Benzimidazole derivatives as potent JAK1-selective inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2015, vol. 58, no. 18, pp. 7596–7602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01263
12. Lee S.M., Yen H.L. Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral Res.*, 2012, vol. 96, iss. 3, pp. 391–404. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.09.013
13. Pécheur E.I., Borisevich V., Halfmann P., Morrey J.D., Smee D.F., Prichard M., Mire C.E., Kawaoka Y., Geisbert T.W., Polyak S.J. The synthetic antiviral drug arbidol inhibits globally prevalent pathogenic viruses. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 6, pp. 3086–3092. doi: 10.1128/JVI.02077-15
14. Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 98, iss. 2, pp. 174–185. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.014
15. Scholtissek C., Quack G., Klenk H.D., Webster R.G. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives. *Antiviral Res.*, 1998, vol. 37, iss. 2, pp. 83–95. doi: 10.1016/S0166-3542(97)00061-2
16. Torriani F.J., Rodriguez-Torres M., Rockstroh J.K., Lissen E., Gonzalez-García J., Lazzarin A., Carosi G., Sasadeusz J., Katlama C., Montaner J., Sette H.Jr., Pässe S., De Pampillis J., Duff F., Schrenk U.M., Dieterich D.T., APRICOT Study Group. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 351, pp. 438–450. doi: 10.1056/NEJMoa040842
17. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2014, vol. 1323, 115–139. doi: 10.1111/nyas.12462
18. Zarubaev V.V., Morkovnik A.S., Divaeva L.N., Karpinskaya L.A., Borodkin G.S. Tautomeric and non-tautomeric N-substituted 2-iminobenzimidazolines as new lead compounds for the design of anti-influenza drugs: an in vitro study. *Bioorg. Med. Chem.*, 2016, vol. 24, iss. 22, pp. 5796–5803. doi: 10.1016/j.bmc.2016.09.036

Авторы:

Зарубаев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Васильева С.В., к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск, Россия;
Есаулкова Я.Л., студентка, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия;
Гаршинина А.В., научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Вепринцева В.М., студентка, ФГБОУ ВО СПбГАВМ, Санкт-Петербург, Россия;
Галочкина А.В., к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Процак Е.С., студент, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Теселкин И.В., студент, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Санкт-Петербург, Россия;
Морковник А.С., д.х.н., зав. лабораторией органического синтеза, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Диваева Л.Н., к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Лаврентьева И.Н., д.б.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Zarubaev V.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Vasilieva S.V., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Chemistry of Nucleic Acids, Novosibirsk, Russian Federation;
Esaulkova Y.L., Student, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;
Garshinina A.V., Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Vepintseva V.M., Student, Saint Petersburg Veterinary Academy, St. Petersburg, Russian Federation;
Galochkina A.V., PhD (Medicine), Junior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Protsak Y.S., Student, First Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;
Teselkin I.V., Student, St. Petersburg State Technological Institute (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation;
Morkovnik A.S., PhD, MD (Chemistry), Head of the Laboratory of Organic Synthesis, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Divaeva L.N., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Organic Synthesis, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Lavrentieva I.N., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

РЕГУЛЯТОРНОЕ ВЛИЯНИЕ МОНОЦИТОВ КРОВИ НА ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ГРАНУЛОЦИТАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ И СОСТОЯНИЕ ИХ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА ПРИ РАСПРОСТРАНЕННОМ ГНОЙНОМ ПЕРИТОНИТЕ

А.А. Савченко^{1,2}, А.Г. Борисов^{1,2}, Д.В. Черданцев², О.В. Первова²,
И.В. Кудрявцев^{3,4}, В.Д. Беленюк¹

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗРФ, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение регуляторного влияния моноцитов и их субпопуляций на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва при распространенном гнойном перитоните (РГП). Обследовано 24 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–65 лет. В качестве контроля обследовано 25 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование популяционного состава моноцитов и гранулоцитарных лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе Sysmex XE-5000 (Sysmex Inc., США) и проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением набора антител Cytodiff (Beckman Coulter, США). Исследование количества моноцитов, экспрессирующих HLA-DR- и CD64-рецептор, проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции к площади спонтанной и определяли как индекс активации. Установлено, что иммунновоспалительный процесс при РГП характеризуется снижением количества классических моноцитов в периферической крови и увеличением содержания неклассических моноцитов. При РГП в периферической крови понижается уровень моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-рецепторы. Изменение соотношения субпопуляций моноцитов характеризует повышение роли провоспалительной фракции в патогенезе РГП. Изменения в популяционном составе гранулоцитов в крови у больных РГП также характе-

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Беленюк В.Д. Регуляторное влияние моноцитов крови на популяционный состав гранулоцитов и состояние их респираторного взрыва при распространенном гнойном перитоните // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 201–201. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-201-210

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdantsev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Belenyuk V.D. Regulatory influence of blood monocytes on the population composition of granulocytes and the state of their respiratory burst in the widespread purulent peritonitis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 201–201. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-201-210

ризуют развитие острого воспалительного процесса. При этом наблюдается снижение количества базофилов в периферической крови, что, по-видимому, определяется наличием аллергического компонента при РГП и, соответственно, их миграцией в зону воспаления. У больных РГП обнаружена активация респираторного взрыва гранулоцитов крови, интенсивность которого определяется синтезом первичных и вторичных активных форм кислорода. Результаты корреляционного анализа позволили установить, что при РГП повышается регуляторная роль неклассических моноцитов, направленная на стимуляцию воспалительных процессов (повышение количества зрелых и незрелых форм нейтрофилов и стимуляция активности респираторного взрыва гранулоцитов). Выявленные особенности регуляторного влияния моноцитов на популяционный состав и интенсивность респираторного взрыва гранулоцитов могут быть использованы при разработке иммунотерапевтических методов, направленных на снижение активности воспалительного процесса при РГП.

Ключевые слова: перитонит, моноциты, гранулоциты, фенотип, популяционный состав, регуляция, респираторный взрыв.

REGULATORY INFLUENCE OF BLOOD MONOCYTES ON THE POPULATION COMPOSITION OF GRANULOCYTES AND THE STATE OF THEIR RESPIRATORY BURST IN THE WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS

Savchenko A.A.^{a,b}, Borisov A.G.^{a,b}, Cherdancev D.V.^b, Pervova O.V.^b, Kudryavcev I.V.^{c,d}, Belenyuk V.D.^a

^a Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^d Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to investigate the regulatory effect of monocytes and their subpopulations on the population composition of granulocyte leukocytes and the state of their respiratory burst in widespread purulent peritonitis (WPP). The study involved 24 patients aged 30-65 with acute surgical diseases and injuries of abdominal organs complicated by WPP. As a control 25 relatively healthy people of the same age range were examined. A study of the population composition of monocytes and granulocyte leukocytes in blood was performed using a two-platform technology on the hematological analyzer Sysmex XE-5000 (Sysmex Inc., USA) and FC-500 flow cytometer (Beckman Coulter, USA) using the Cytodiff antibody kit (Beckman Coulter, USA). A study of the monocytes number expressing HLA-DR- and CD64-receptor was performed by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood. The respiratory burst state of neutrophilic granulocytes was studied by chemiluminescence analysis on a 36-channel chemiluminescence analyzer BLM-3607 (MedBioTech, Russia). As indicators of chemiluminescence were used luminol and lucigenin. The enhancement of chemiluminescence induced by zymosan was evaluated by the ratio of the area of the induced chemiluminescence to the spontaneous area and was defined as the activation index. It has been established that the immune-inflammatory process in WPP is characterized by a decrease in the number of classical monocytes in the peripheral blood and an increase in the content of non-classical monocytes. In WPP in peripheral blood the level of monocytes expressing HLA-DR receptors decreases. The change in the ratio of monocytes subpopulations characterizes the increase in the role of the proinflammatory fraction in the WPP pathogenesis. Changes in the population composition of granulocytes in the blood in patients with WPP also characterize the development of an acute inflammatory process. In this case, there is a decrease in the number of basophils in the peripheral blood, which, apparently, is determined by the presence of an allergic component in WPP and, accordingly, their migration to the inflammation area. In patients with WPP activation of a respiratory burst of granulocytes of blood was detected, the intensity of which is determined by the synthesis of primary and secondary active oxygen species. The results of the correlation analysis made it possible to establish that in WPP the regulatory role of non-classical monocytes increases aimed at stimulating the inflammatory processes (an increase in the number of mature and immature forms of neutrophils and stimulation of the activity of a respiratory explosion of granulocytes). The revealed features of the regulatory effect of monocytes on the population composition and the intensity of the respiratory burst of granulocytes can be used in the development of immunotherapeutic methods aimed at reducing the activity of the inflammatory process in WPP.

Key words: peritonitis, monocytes, granulocytes, phenotype, population composition, regulation, respiratory burst.

Введение

Исследования механизмов регуляции инфекционно-воспалительных процессов до сих пор привлекают пристальное внимание. Связано это, прежде всего, с необходимостью определения фундаментальных процессов иммунной регуляции воспаления, что позволит

разрабатывать новые методы лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, тяжесть течения которых может создавать риски для жизни пациента. Одним из таких заболеваний является распространенный гнойный перитонит (РГП). Летальность данного заболевания даже при использовании мощного арсенала средств интенсивной терапии сохраняется

на уровне 32,0–43,9%, а при генерализации инфекции и развитии полиорганной недостаточности может достигать 75,8–100% [26, 29]. Характер течения заболевания и исход, а также вероятность развития инфекционных осложнений определяются не только тяжестью основного патологического процесса, адекватностью оперативного вмешательства и медикаментозного лечения в послеоперационном периоде, но и зависят от происходящих изменений в системе иммунитета [5].

Основными эффекторными клетками воспалительного процесса являются гранулоциты, которые являются высокореактивным звеном врожденного иммунитета, первыми мигрируя в очаг воспаления [5, 13, 28]. Эффективность противомикробной защиты организма во многом зависит от фагоцитоза и механизмов внешнего киллинга гранулоцитов [7, 11, 14]. Гранулоциты чувствительны к регуляторному воздействию как со стороны регуляторных систем организма, так и самой иммунной системы. Lan F. et al. (2016) установил, что нейтрофильные гранулоциты при воздействии IL-33 на фоне перитонита повышали уровень миграционной активности, более активно экспрессировали рецепторы для компонентов комплемента и синтезировали активные формы кислорода (АФК) [21]. В то же время, как отмечает Watzlawick R. et al. (2015), интенсивность воспалительной реакции должна контролироваться, что реализуется, в частности, через IL-27, повышение концентрации которого вызывало снижение выхода гранулоцитов из костного мозга и ингибировало их миграцию в перитонеальную полость при РГП [31]. Нами ранее обнаружено, что при РГП нарушается цитокиновая регуляция респираторного взрыва нейтрофилов [7]. Все это определяет необходимость дальнейших исследований регуляторного влияния на функцию гранулоцитарных лейкоцитов при перитонитах.

Моноциты также являются клетками врожденного иммунитета. В настоящее время интерес к данной популяции клеток крови определяется преимущественно двумя направлениями: участие моноцитов в воспалительных процессах и дифференцировка моноцитов в макрофаги и дендритные клетки [10, 23, 27]. Однако необходимо отметить, что и сами моноциты, также как и их потомки — макрофаги и дендритные (стимулирующие развитие адаптивного иммунного ответа в качестве антигенпрезентирующих клеток), являются регуляторными клетками, в том числе, и для клеток врожденного иммунитета [2, 8, 24]. К тому же моноциты, долгое время рассматривающиеся в качестве моноклеточной популяции, на сегодняшний день, в зависимости от экспрессии CD16-рецептора, делятся на две основные субпопуляции: классические моноциты (CD14⁺CD16⁻) и неклассические (CD14⁺CD16⁺) [1, 6, 16]. При этом регуляторная роль субпопуляций моноцитов на гранулоцитарные клетки крови при РГП до сих пор не изучена.

Целью исследования явилось изучение регуляторного влияния моноцитов и их субпопуляций на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва при РГП.

Материалы и методы

На базе Красноярского краевого гнойно-септического центра КГБУЗ «Краевая клиническая больница» до начала лечения обследовано 24 пациента с острыми хирургическими заболеваниями и травмами органов брюшной полости, осложнившимися РГП, в возрасте 30–65 лет. Из исследования были исключены пациенты, у которых причиной РГП являлись: острый деструктивный панкреатит (панкреонекроз), тотальный мезентериальный тромбоз, онкологические заболевания, туберкулез. В качестве контроля обследовано 25 относительно здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование популяционного состава моноцитов и гранулоцитарных лейкоцитов крови осуществляли по двухплатформенной технологии на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-5000 (Sysmex Inc., США) и проточном цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием набора антител CytoDiff: CD36-FITC, CD2-PE, CD294(CRTH2)-PE, CD19-ECD, CD16-PC5 и CD45-PC7 [4]. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с инструкцией изготовителя: 100 мкл цельной крови инкубировали с 10 мкл красителя CytoDiff в течение 20 мин при комнатной температуре. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ и подсчет процентного и абсолютного количества клеток проводились после регистрации 20 000 лейкоцитов с использованием программы автоматического гейтирования CytoDiff CXP (Beckman Coulter, США) [19].

Исследование количества моноцитов, экспрессирующих HLA-DR- и CD64-рецептор, проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с помощью моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X) и PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) в следующей панели: HLA-DR-FITC/CD14-PE/CD45-ECD/CD64-PC5. Пробоподготовку и цитометрический анализ осуществляли по стандартной методике [3, 22]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 моноцитов.

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [7]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 мин на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе БЛМ-3607 (ООО «МедБиоТех», Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{\max}), максимальное значение интенсивности (I_{\max}), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции ($S_{\text{инд.}}$) к площади спонтанной ($S_{\text{спонт.}}$) и определяли как индекс активации ($S_{\text{инд.}}/S_{\text{спонт.}}$).

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного

размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании популяционного состава моноцитов крови обнаружено, что у больных РГП снижено относительное количество классических моноцитов ($SS^{\text{int}}CD16-CD2-CRTH2-CD19-CD36^+$), но повышается процентный и абсолютный уровень неклассических моноцитов ($SS^{\text{int}}CD16^+CD2-CRTH2-CD19-CD36^+$) (табл. 1). При этом соотношение классических моноцитов с неклассическими при РГП в 2,9 раза снижено относительно контрольных значений. У больных РГП также снижено процентное содержание моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-маркер.

При РГП в 1,4 раза повышается количество лейкоцитов в периферической крови (табл. 2). У обследованных пациентов выявляется увеличение относительного и абсолютного количе-

Таблица 1. Количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR- и CD64-рецепторы, и их популяционный состав у больных РГП [$Me (Q_{0,25} - Q_{0,75})$]

Table 1. The number of monocytes expressing HLA-DR- and CD64-receptors and their population composition in patients with WPP [$Me (Q_{0,25} - Q_{0,75})$]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 25	Больные РГП WPP Patients n = 24	p
Моноциты Monocytes, %	5,3 (5,1–6,5)	4,8 (3,2–6,2)	
Моноциты, $10^9/\text{л}$ Monocytes, $10^9/\text{L}$	0,39 (0,34–0,40)	0,58 (0,27–0,70)	
Классические моноциты Classical monocytes, %	96,9 (96,2–97,4)	91,5 (68,0–95,1)	0,012
Классические моноциты, $10^9/\text{л}$ Classical monocytes, $10^9/\text{L}$	0,34 (0,21–0,38)	0,41 (0,14–0,63)	
Неклассические моноциты Nonclassical monocytes, %	3,1 (2,6–3,8)	8,5 (4,9–32,0)	0,012
Неклассические моноциты, $10^9/\text{л}$ Nonclassical monocytes, $10^9/\text{L}$	0,012 (0,008–0,020)	0,049 (0,017–0,159)	0,041
Классические моноциты/Неклассические моноциты Classical monocytes/Nonclassical monocytes	31,36 (25,52–38,10)	10,72 (2,23–19,44)	0,012
HLA-DR⁺, %	92,2 (72,4–96,9)	83,1 (63,3–88,9)	0,040
HLA-DR⁺, $10^9/\text{л}$	0,34 (0,27–0,37)	0,48 (0,20–0,59)	
CD64⁺, %	76,1 (65,8–81,2)	76,2 (65,6–84,9)	
CD64⁺, $10^9/\text{л}$	0,27 (0,23–0,36)	0,32 (0,18–0,58)	
CD64⁺HLA-DR⁺, %	71,1 (56,3–77,7)	68,4 (50,0–78,6)	
CD64⁺HLA-DR⁺, $10^9/\text{л}$	0,27 (0,21–0,30)	0,30 (0,11–0,54)	

Таблица 2. Популяционный состав гранулярных лейкоцитов крови у больных РГП [Me ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$)]
 Table 2. The population composition of the granular blood leukocytes in the patients with WPP [Me ($Q_{0,25} - Q_{0,75}$)]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 25	Больные РГП WPP Patients n = 24	p
Лейкоциты, $10^9/л$ Leukocytes, $10^9/L$	7,46 (6,50–7,75)	10,37 (7,79–12,42)	0,007
Юные Juveniles, %	0,11 (0,06–0,47)	0,13 (0,07–0,21)	
Юные, $10^9/л$ Juveniles, $10^9/L$	0,007 (0,005–0,036)	0,012 (0,007–0,021)	
Палочкоядерные нейтрофилы Bands, %	0,11 (0,08–0,40)	0,71 (0,17–4,38)	0,007
Палочкоядерные нейтрофилы, $10^9/л$ Bands, $10^9/L$	0,009 (0,005–0,024)	0,06 (0,02–0,33)	0,003
Сегментоядерные нейтрофилы Polymorphonuclear neutrophils, %	56,0 (45,7–60,5)	81,9 (74,9–86,9)	< 0,001
Сегментоядерные нейтрофилы, $10^9/л$ Polymorphonuclear neutrophils, $10^9/L$	3,91 (3,49–4,41)	7,93 (6,58–9,37)	< 0,001
Эозинофилы Eosinophils, %	2,5 (1,8–3,3)	2,0 (0,6–4,8)	
Эозинофилы, $10^9/л$ Eosinophils, $10^9/L$	0,18 (0,07–0,28)	0,18 (0,05–0,50)	
Базофилы Basophils, %	0,9 (0,3–1,2)	0,04 (0,02–0,08)	< 0,001
Базофилы, $10^9/л$ Basophils, $10^9/L$	0,051 (0,022–0,086)	0,004 (0,002–0,008)	< 0,001

ства палочкоядерных ($SS^{high}CD45^{int}CD16^{-}CD2^{-}CRTH2^{-}$) и сегментоядерных ($SS^{high}CD45^{high}CD16^{+}$) нейтрофилов, но при снижении процентного и абсолютного уровня базофилов ($SS^{int}CD45^{int}CD16^{-}CD2^{+}$).

Исследование хемилюминесцентной активности гранулоцитов крови позволило установить, что при РГП увеличивается максимум интенсивности и площадь под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции (табл. 3). Индекс активации по люцигенин-зависимой хемилюминесценции у обследованных пациентов в 4,6 раза превышает контрольные значения. Кроме того, у больных РГП в 2,8 раза увеличивается время выхода на максимум и в 4,1 раза повышается площадь под кривой спонтанной люминол-зависимой хемилюминесценции. В 3,2 раза при РГП увеличен максимум интенсивности и в 9,8 раза площадь под кривой зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции. Индекс активации гранулоцитов по люминол-зависимой хемилюминесценции у больных РГП в 2,5 раза превышает контрольные значения.

С помощью корреляционного анализа исследована взаимосвязь моноцитов с уровнем различных популяций гранулоцитов крови и интенсивностью их хемилюминесцентной

активности. Обнаружено, что у лиц контрольной группы относительное количество $HLA-DR^{+}$ -моноцитов отрицательно коррелирует со временем выхода на максимум спонтанной и зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции гранулоцитов ($r = -0,86$, $p = 0,014$ и $r = -0,87$, $p = 0,012$ соответственно). Относительное содержание $CD64^{+}$ -моноцитов также отрицательно взаимосвязано с абсолютным количеством лейкоцитов в крови ($r = -0,69$, $p = 0,028$), тогда как уровень моноцитов, одновременно экспрессирующих $CD64$ - и $HLA-DR$ -рецепторы, отрицательно коррелирует с абсолютным количеством лейкоцитов ($r = -0,70$, $p = 0,026$), а также временем выхода на максимум спонтанной и индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции гранулоцитов ($r = -0,79$, $p = 0,036$ и $r = -0,82$, $p = 0,023$ соответственно).

У больных РГП относительное содержание общих моноцитов в крови отрицательно коррелирует с процентным количеством юных гранулоцитов ($r = -0,52$, $p = 0,009$) и базофилом ($r = -0,41$, $p = 0,049$), а также положительно — с максимумом интенсивности зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,65$, $p = 0,011$) и индексом активации по люминол-зависимой хемилюминесценции гранулоцитов ($r = 0,59$, $p = 0,026$). Процентный

уровень классических моноцитов отрицательно взаимосвязан с относительным количеством палочкоядерных нейтрофилов ($r = -0,46$, $p = 0,024$), тогда как процентное содержание неклассических моноцитов уже положительно коррелирует с данной фракцией гранулоцитов ($r = 0,46$, $p = 0,024$) у больных РГП. Относительное количество HLA-DR⁺-моноцитов положительно коррелирует с такими респираторного взрыва, как максимумы интенсивности индуцированной люцигенин- и люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,62$, $p = 0,033$ и $r = 0,63$, $p = 0,021$ соответственно), а также с площадью под кривой зимозан-индуцированной люцигенин-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,59$, $p = 0,045$). Процентный уровень CD64⁺-моноцитов крови у обследованных пациентов положительно взаимосвязан с индексом активации по люцигенин-зависимой хемилюминесценции гранулоцитов ($r = 0,72$, $p = 0,008$). Относительный уровень CD64⁺HLA-DR⁺-моноцитов крови у больных РГП отрицательно взаимосвязан с процентным содержанием юных гранулоцитов ($r = -0,68$, $p < 0,001$) и поло-

жительно — с количеством лейкоцитов в крови ($r = 0,55$, $p = 0,007$), уровнем сегментоядерных нейтрофилов ($r = 0,53$, $p = 0,009$) и максимумом зимозан-индуцированной люминол-зависимой хемилюминесценции ($r = 0,62$, $p = 0,025$) гранулоцитов.

Обсуждение

Иммуновоспалительная реакция при РГП характеризуется снижением процентного содержания классических моноцитов в периферической крови и увеличением относительного и абсолютного количества неклассических моноцитов. Субпопуляция классических моноцитов определяется как крупные клетки с высоким уровнем фагоцитарной активности. Для них характерен повышенный уровень экспрессии таких рецепторов, как CCR2, CD36, CD64, CD62L и низкий уровень синтеза TNF α и IL-1 [1, 16]. Неклассические моноциты представлены некрупными клетками с низкой фагоцитарной и оксидазной активностью. На их поверхности активно экспрессируются CX3CR1-, CD11c-

Таблица 3. Хемилюминесцентная активность гранулоцитов у больных РГП [Me (Q_{0,25} – Q_{0,75})]

Table 3. Chemiluminescent activity of granulocytes in patients with WPP [Me (Q_{0,25} – Q_{0,75})]

Показатели Parameters	Контроль Control n = 25	Больные РГП WPP Patients n = 24	p
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence			
T _{max} , sec.	781 (536–1854)	954 (676–2055)	
I _{max} , r.u. × 10 ³	1,53 (0,65–3,70)	6,03 (1,77–20,56)	0,009
S, r.u. × sec. × 10 ⁶	1,29 (0,95–4,57)	4,39 (1,92–23,26)	0,018
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence			
T _{max} , sec.	994 (458–1343)	1239 (747–1533)	
I _{max} , r.u. × 10 ³	5,07 (0,41–6,63)	41,34 (13,76–96,65)	0,002
S, r.u. × sec. × 10 ⁶	1,30 (0,54–5,72)	38,16 (33,59–103,68)	< 0,001
S _{инд.} /S _{спонт.} S _{ind.} /S _{spont.}	1,10 (0,77–1,85)	5,09 (2,45–28,23)	< 0,001
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence			
T _{max} , sec.	484 (239–962)	1340 (541–2976)	0,002
I _{max} , r.u. × 10 ³	16,95 (2,82–73,36)	27,54 (13,96–74,04)	
S, r.u. × sec. × 10 ⁶	6,62 (3,28–35,71)	27,23 (14,33–81,72)	0,034
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence			
T _{max} , sec.	790 (428–1431)	837 (543–998)	
I _{max} , r.u. × 10 ³	39,75 (2,10–75,87)	128,16 (55,30–147,74)	0,025
S, r.u. × sec. × 10 ⁶	16,96 (2,24–36,72)	166,86 (47,16–211,32)	0,006
S _{инд.} /S _{спонт.} S _{ind.} /S _{spont.}	1,21 (0,89–1,79)	3,04 (1,69–9,73)	0,016

Примечание: sec. — секунды, r.u. — relative units (относительные единицы).

Note: T_{max} — time to maximum, I_{max} — maximum intensity value, reflecting the maximum reactive oxygen species level synthesis, S — the area under the curve, describing total synthesis of reactive oxygen species during 90 min. S_{инд.}/S_{спонт.} — the ration between zymosan-induced and spontaneous luminal-dependent chemiluminescence.

и HLA-DR-молекулы, тогда как CD62L и CD64 практически отсутствует. Данная субпопуляция активно синтезирует провоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β и IL-6) и определяется как провоспалительная [6, 12]. Необходимо отметить, что повышение содержания неклассических моноцитов отмечено при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях [12, 34]. Также особенностью моноцитов крови у больных РГП является снижение содержания HLA-DR⁺-клеток. HLA-DR (антиген главного комплекса гистосовместимости II класса) является гетеродимерным гликопротеином, экспрессируется на различных типах клеток иммунной системы и является критическим для осуществления эффективной антигенпрезентации [20, 32].

При РГП значительно меняется популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов. Так, на фоне повышения количества лейкоцитов в крови увеличивается относительное и абсолютное содержание палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, но при снижении процентного и абсолютного уровня базофилов. Выявленная при РГП нейтрофильная реакция является классической для инфекционно-воспалительных процессов. Однако также наблюдается реакция крови со стороны базофилов. Можно предположить, что значительное снижение количества базофилов определяется наличием аллергического компонента при РГП и, соответственно, их миграцией в зону воспаления [15, 25, 33].

Состояние дыхательного взрыва гранулоцитов крови было оценивалось по хемилюминесцентной реакции с двумя индикаторами — люцигенином и люминолом. Люцигенин-зависимая хемилюминесценция отражает уровень синтеза супероксид-радикала, относящийся к первичным АФК, который синтезируется мембранной НАДФН-оксидазой [18, 30]. Супероксид-радикал является наиболее бактерицидным АФК, но уровень цитотоксичности гранулоцитов также зависит и от вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). Пул вторичных АФК формируется такими ферментами, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. [17]. При этом люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию, как с первичной АФК, так и вторичными АФК [7, 9]. У больных РГП по сравнению с контрольными значениями повышен уровень спонтанного и зимозан-индуцированного синтеза супероксид-радикала гранулоцитами крови, при увеличении индекса активации клеток по люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Индекс активации характеризует уровень метаболических резервов клеток, которые определяют возможность до-

полнительной индукции респираторного взрыва [5]. В частности, для стимуляции активности НАДФН-оксидазы необходимо повышение активности пентозофосфатного цикла и его субстратное наполнение [18, 30].

Респираторный взрыв гранулоцитов крови у больных РГП также характеризуется высоким уровнем спонтанного и индуцированного синтеза вторичных АФК. При этом также повышается уровень индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции, но при увеличении времени выхода на максимум спонтанного синтеза вторичных АФК. Время выхода на максимум характеризует период от момента регуляторного и/или антигенного воздействия на клетки до периода максимальной активации ферментов, синтезирующих АФК. Следовательно, у больных РГП при активации респираторного взрыва, тем не менее, выявляются показатели, отражающие нарушения в процессе синтеза вторичных АФК.

С помощью корреляционного анализа мы определили особенности регуляторного влияния моноцитов на гранулоцитарные клетки. Обнаружено, что у лиц контрольной группы популяционный состав моноцитов крови не влияет на популяционный состав гранулоцитов. При этом у лиц контрольной группы с показателями дыхательного взрыва гранулоцитов и уровнем лейкоцитов в крови взаимосвязаны только активированные моноциты, экспрессирующие HLA-DR⁺ и CD64-рецепторы. Все взаимосвязи выявленные взаимосвязи отрицательные, что отражает наличие конкурентных взаимоотношений между активированными моноцитами и гранулоцитами крови.

У больных РГП обнаружены более многочисленные и разнообразные (как по знаку, так и по взаимосвязанным показателям) корреляционные связи. Содержание общих моноцитов отрицательно взаимосвязано с юными и базофильными гранулоцитами, что, с одной стороны, определяется воспалительной реакцией при данном заболевании (выброс незрелых лейкоцитов в кровь), с другой — миграцией базофилов в зону воспаления, что уже обсуждалось выше. Обнаружены взаимосвязи субпопуляционного состава моноцитов с уровнем палочкоядерных нейтрофилов. Причем если количество классических моноцитов отрицательно коррелирует с уровнем палочкоядерных нейтрофилов, то содержание неклассических — положительно. Подобные взаимосвязи еще раз характеризуют различную роль субпопуляций моноцитов в иммунопатогенезе инфекционно-воспалительных заболеваний. Также с популяционным составом гранулоцитов взаимосвязаны моноциты, экспрессирующие HLA-DR⁺ и CD64-рецепторы. С показателями

респираторного взрыва гранулоцитов уровень общей фракции моноцитов крови у больных РГП, также как и активированные моноциты взаимосвязаны только положительно. В целом, можно заключить, что выявленные корреляционные взаимосвязи у больных РГП характеризуют повышение провоспалительной функции моноцитов и их стимулирующее влияние на функцию гранулоцитов.

Заключение

При исследовании регуляторного влияния моноцитов и их субпопуляций на популяционный состав гранулоцитарных лейкоцитов и состояние их респираторного взрыва у больных РГП обнаружено, что иммуновоспалительный процесс при РГП характеризуется снижением количества классических моноцитов в периферической крови и увеличением содержания неклассических моноцитов. Также при РГП в периферической крови понижается уровень моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-рецепторы. Изменение соотношения субпопуляций моноцитов характеризует повышение роли провоспалительной фракции в патогенезе РГП. Изменения в популяционном составе гранулоцитов в крови у больных РГП также характеризуют развитие острого воспалительного процесса. При этом наблюдается снижение количества базофилов в периферической крови, что, по-видимому, определяется наличием аллергического компонента при РГП и, соответственно, их миграцией в зону воспаления. У больных РГП обнаружена активация респираторного взрыва гранулоцитов крови, интенсивность которого

определяется синтезом первичных и вторичных АФК. Установлено, что респираторный взрыв гранулоцитов у обследованных пациентов поддерживается наличием внутриклеточных метаболических резервов. В то же время, при РГП выявляется увеличение времени выхода на максимум синтеза вторичных АФК, что определяет наличие нарушений в механизмах респираторного взрыва гранулоцитов. С помощью корреляционного анализа были охарактеризованы особенности регуляторного влияния моноцитов на гранулоцитарные клетки. Обнаружено, что, если у здоровых людей данные взаимосвязи немногочисленны и преимущественно отражают конкурентные взаимоотношения между активированными моноцитами и гранулоцитами крови, то при РГП корреляционные связи более многочисленны и разнообразные, как по знаку, так и по взаимосвязанным показателям. В целом результаты корреляционного анализа позволили установить, что при РГП повышается регуляторная роль неклассических моноцитов, направленная на стимуляцию воспалительных процессов (повышение количества зрелых и незрелых форм нейтрофилов и стимуляция активности респираторного взрыва гранулоцитов). Выявленные особенности регуляторного влияния моноцитов на популяционный состав и интенсивность респираторного взрыва гранулоцитов могут быть использованы при разработке иммунотерапевтических методов, направленных на снижение активности воспалительного процесса при РГП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Список литературы/References

1. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 4–5. С. 305–312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudryavtsev I.V., Grigoriev E.V., Velikanova E.A., Bairakova Y.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 4–5, pp. 305–312. doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-305-312 (In Russ.)]
2. Евстратова В.С., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б., Ханферьян Р.А. Особенности секреции хемокинов мононуклеарными и дендритными клетками: роль гистаминовых рецепторов H3/H4-типа // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 437–442. [Evstratova V.S., Riger N.A., Nikityuk D.B., Khanferyan R.A. Chemokine secretion patterns in mononuclear and dendritic cells: role of histamine type h3/h4 receptors. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 5, pp. 437–442. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-437-442 (In Russ.)]
3. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 1. С. 19–26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 1, pp. 19–26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Борисов А.Г., Анисимова Е.Н., Беленюк В.Д., Кудрявцев И.В., Решетников И.В., Квятковская С.В., Цейликман В.Э., Зорин А.Н. Исследование фенотипа лейкоцитов крови у больных онихомикозами с помощью метода Hematoflow // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 339–348. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Anisimova E.N., Belenyuk V.D., Kudryavtsev I.V., Reshetnikov I.V., Kvjatkovskaja S.V., Cejlikman V.J., Zorin A.N. Blood leukocytes phenotyping by hematoflow method in patients with onychomycosis. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 339–348. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-339-348 (In Russ.)]

5. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 5. С. 475–482. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Gvozdev I.I. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 5, pp. 475–482. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482 (In Russ.)]
6. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошеев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечноклеточным раком // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17, № 2. С. 141–150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 141–150. doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-141-150 (In Russ.)]
7. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление. 2013. Т. 12, № 1–2. С. 115–119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, vol. 12, no. 1–2, pp. 115–119. (In Russ.)]
8. Agrawal A., Agrawal S., Gupta S. Role of dendritic cells in inflammation and loss of tolerance in the elderly. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8: 896. doi: 10.1155/2015/794072
9. Allen R.C. Neutrophil leukocyte: combustive microbicidal action and chemiluminescence. *J. Immunol. Res.*, 2015, vol. 2015: 794072, 11 p. doi: 10.1155/2015/794072
10. Baek K., Chung I. Cadmium exposure is associated with monocyte count and monocyte to HDL ratio, a marker of inflammation and future cardiovascular disease in the male population. *J. Korean Med. Sci.*, 2017, vol. 32, no. 9, pp. 1415–1422. doi: 10.3346/jkms.2017.32.9.1415
11. Cortjens B., Lutter R., Boon L., Bem R.A., van Woensel J.B. Pneumovirus-induced lung disease in mice is independent of neutrophil-driven inflammation. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 12: e0168779. doi: 10.1371/journal.pone.0168779
12. Cox S.N., Serino G., Sallustio F., Blasi A., Rossini M., Pesce F., Schena F.P. Altered monocyte expression and expansion of non-classical monocyte subset in IgA nephropathy patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2015, vol. 30, iss. 7, pp. 1122–1232. doi: 10.1093/ndt/gfv017
13. El-Benna J., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Marie J.C., Gougerot-Pocidallo M.A., Dang P.M. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2016, vol. 273, iss. 1, pp. 180–193. doi: 10.1111/imr.12447
14. Fine N., Dimitriou I.D., Rullo J., Sandí M.J., Petri B., Haitsma J., Ibrahim H., La Rose J., Glogauer M., Kubes P., Cybulsky M., Rottapel R. GEF-H1 is necessary for neutrophil shear stress-induced migration during inflammation. *J. Cell Biol.*, 2016, vol. 215, no. 1, pp. 107–119. doi: 10.1083/jcb.201603109
15. Gilmore J.F., Kim M., LaSalvia M.T., Mahoney M.V. Treatment of enterococcal peritonitis with intraperitoneal daptomycin in a vancomycin-allergic patient and a review of the literature. *Perit. Dial. Int.*, 2013, vol. 33, no. 4, pp. 353–357. doi: 10.3747/pdi.2012.00277
16. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, iss. 110, no. 12, pp. 1546–1548. doi: 10.1161/RES.0b013e31825ec26d
17. Ichibangase T., Ohba Y., Kishikawa N., Nakashima K., Kuroda N. Evaluation of lophine derivatives as L-012 (luminol analog)-dependent chemiluminescence enhancers for measuring horseradish peroxidase and H₂O₂. *Luminescence*, 2014, vol. 29, iss. 2, pp. 118–121. doi: 10.1002/bio.2513
18. Jha J.C., Watson A.M.D., Mathew G., de Vos L.C., Jandeleit-Dahm K. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease. *Clin. Sci.*, 2017, vol. 131, no. 10, pp. 981–990. doi: 10.1042/CS20160846
19. Kahng J., Kim Y., Kim M., Oh E.J., Park Y.J., Han K. Flow cytometric white blood cell differential using CytoDiff is excellent for counting blasts. *Ann. Lab. Med.*, 2015, vol. 35, no. 1, pp. 28–34. doi: 10.3343/alm.2015.35.1.28
20. Laborde R.R., Lin Y., Gustafson M.P., Bulur P.A., Dietz A.B. Cancer vaccines in the world of immune suppressive monocytes (CD14⁺HLA-DR^{lo/neg} cells): the gateway to improved responses *Front. Immunol.*, 2014, vol. 5, pp. 147. doi: 10.3389/fimmu.2014.00147
21. Lan F., Yuan B., Liu T., Luo X., Huang P., Liu Y., Dai L., Yin H. Interleukin-33 facilitates neutrophil recruitment and bacterial clearance in *S. aureus*-caused peritonitis. *Mol. Immunol.*, 2016, vol. 72, pp. 74–80. doi: 10.1016/j.molimm.2016.03.004
22. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, pp. 191–200. doi: 10.1038/nri3158
23. Mao Y., Koga J.I., Tokutome M., Matoba T., Ikeda G., Nakano K., Egashira K. Nanoparticle-mediated delivery of pitavastatin to monocytes/macrophages inhibits left ventricular remodeling after acute myocardial infarction by inhibiting monocyte-mediated Inflammation. *Int. Heart J.*, 2017, vol. 58, iss. 4, pp. 615–623. doi: 10.1536/ihj.16-457
24. Oishi Y., Manabe I. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ Aging Mech. Dis.*, 2016, vol. 2: 16018. doi: 10.1038/npjamd.2016.18
25. Schwartz C., Eberle J.U., Voehringer D. Basophils in inflammation. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016, vol. 778, pp. 90–95. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.04.049
26. Singal R., Dhar S., Zaman M., Singh B., Singh V., Sethi S. Comparative evaluation of intra-operative peritoneal lavage with super oxidized solution and normal saline in peritonitis cases; randomized controlled trial. *Maedica*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 277–285.
27. Singh T.P., Zhang H.H., Borek I., Wolf P., Hedrick M.N., Singh S.P., Kelsall B.L., Clausen B.E., Farber J.M. Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation. *Nat. Commun.*, 2016, vol. 7:13581. doi: 10.1038/ncomms13581
28. Tan S.Y., Weninger W. Neutrophil migration in inflammation: intercellular signal relay and crosstalk. *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, vol. 44, pp. 34–42. doi: 10.1016/j.coi.2016.11.002

29. Van Biesen W., Brown E.A. Diagnostic and therapeutic approach to peritonitis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2017, vol. 32, iss. 8, pp. 1283–1284. doi: 10.1093/ndt/gfx226
30. Wang H., Hartnett M.E. Roles of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase in angiogenesis: isoform-specific effects. *Antioxidants*, 2017, vol. 6, no. 2: 40. doi: 10.3390/antiox6020040
31. Watzlawick R., Kenngott E.E., Liu F.D., Schwab J.M., Hamann A. Anti-inflammatory effects of IL-27 in zymosan-induced peritonitis: inhibition of neutrophil recruitment partially explained by impaired mobilization from bone marrow and reduced chemokine levels. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 9: 0137651. doi: 10.1371/journal.pone.0137651
32. Winkler M.S., Rissiek A., Priefler M., Schwedhelm E., Robbe L., Bauer A., Zahrt C., Zoellner C., Kluge S., Nierhaus A. Human leucocyte antigen (HLA-DR) gene expression is reduced in sepsis and correlates with impaired TNF α response: a diagnostic tool for immunosuppression? *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 8: e0182427. doi: 10.1371/journal.pone.0182427
33. Yamanishi Y., Karasuyama H. Basophils and mast cells in immunity and inflammation. *Semin. Immunopathol.*, 2016, vol. 38, iss. 5, pp. 535–537. doi: 10.1007/s00281-016-0582-0
34. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.*, 2014, vol. 289, iss. 1–2, pp. 135–139. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.03.019

Авторы:

Савченко А.А., д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; зав. кафедрой физиологии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Борисов А.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Черданцев Д.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Первова О.В., д.м.н., профессор кафедры и клиники хирургических болезней им. проф. А.М. Дыхно с курсом эндоскопии и эндохирургии ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия;

Кудрявцев И.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории общей иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

Беленюк В.Д., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии ФГБНУ НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия.

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Head of the Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Cherdantsev D.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department and Clinic Surgical Diseases named after prof. A.M. Dychno with the course of endoscopy and endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Pervova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department and Clinic Surgical Diseases named after prof. A.M. Dychno with the course of endoscopy and endosurgery, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Associate Professor, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

Belenyuk V.D., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Cell Physiology and Pathology, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ ПИОГЕННОГО СТРЕПТОКОККА В ПОДАВЛЕНИИ СИНТЕЗА МОНООКСИДА АЗОТА (NO) МАКРОФАГАМИ

Э.А. Старикова¹, А.В. Соколов^{1,2}, Л.А. Бурова¹, А.С. Головин¹, А.М. Лебедева¹,
В.Б. Васильев^{1,2}, И.С. Фрейдлин^{1,2}

¹ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Защитная роль макрофагов тесно связана с продукцией этими клетками бактерицидных молекул, в ряду которых важное место занимает монооксид азота (NO). Аргинин служит субстратом для продукции NO при участии фермента индуцибельной NO синтазы (iNOS). Экспрессия и активность iNOS регулируются доступностью субстрата (аргинина) в межклеточном пространстве. Бактериальный фермент аргининдеиминаза также использует аргинин в качестве субстрата, вызывая его дефицит для клеток организма хозяина. Целью настоящего исследования стало подтверждение возможной роли аргининдеиминазы *S. pyogenes* в ингибировании синтеза NO макрофагами. Для этого проводили сравнительное изучение влияния на синтез NO макрофагами продуктов разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном аргининдеиминазы (*arcA*). Было показано, что способность *S. pyogenes* M49-16 ингибировать продукцию макрофагами NO зависит от его аргининдеиминазной активности так как изогенный мутант *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном *arcA* утратил способность ингибировать синтез NO. Это позволяет рассматривать изученные нами эффекты *S. pyogenes* как эффекты аргининдеиминазы. Анализ механизмов ингибирующего действия фермента, показал, что подавление синтеза NO не было связано с влиянием продуктов разрушения *S. pyogenes* на жизнеспособность макрофагов. По данным проточной цитометрии, инкубация клеток в присутствии продуктов разрушения *S. pyogenes* исходного и мутантного штаммов не изменяла уровень экспрессии iNOS, то есть не влияла на синтез или стабильность этого фермента. При этом, снижение продукции NO под влиянием исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 коррелировало со снижением содержания в культуральной среде аргинина. А при добавлении в среду экзогенного аргинина, подавляющее продукцию NO действие исходного штамма нивелировалось. Это подтверждает, что основным механизмом ингибирующего действия аргининдеиминазы на продукцию NO макрофагами является истощение запасов аргинина. Недостаток продукции NO при стрептококковой инфекции может приводить к ослаблению бактерицидности макрофагов и к снижению эффективности противомикробной защиты.

Ключевые слова: *S. pyogenes*, макрофаги, аргининдеиминаза, NO, iNOS.

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
Институт экспериментальной медицины.
Тел.: 8 (812) 234-16-69 (служебн.).
Факс: 8 (812) 234-94-89
E-mail: Starickova@yandex.ru

Contacts:

Eleonora A. Starikova
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akademika Pavlova str., 12, Institute of Experimental Medicine.
Phone: +7 (812) 234-16-69 (office).
Fax: +7 (812) 234-94-89
E-mail: Starickova@yandex.ru

Библиографическое описание:

Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Головин А.С., Лебедева А.М.,
Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы пиогенного
стрептококка в подавлении синтеза монооксида азота (NO)
макрофагами // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 211–218.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218

Citation:

Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Golovin A.S., Lebedeva A.M.,
Vasilyev V.B., Freidlin I.S. The role of arginine deiminase from streptococcus
pyogenes in inhibition macrophages nitrogen monoxide (NO) synthesis //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018,
vol. 8, no. 2, pp. 211–218. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-211-218

THE ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* IN INHIBITION MACROPHAGES NITROGEN MONOXIDE (NO) SYNTHESIS

Starikova E.A.^a, Sokolov A.V.^{a,b}, Burova L.A.^a, Golovin A.S.^a, Lebedeva A.M.^a, Vasilyev V.B.^{a,b}, Freidlin I.S.^{a,b}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The protective role of macrophages closely related to the production of bactericidal molecules, in which nitrogen monoxide (NO) play an important role. Arginine serves as a substrate for inducible NO synthase (iNOS) in course of NO production. Expression and activity of iNOS are regulated by the availability of the substrate (arginine) in the intercellular space. The bacterial enzyme arginine deiminase also uses arginine as a substrate, causing its deficiency for host cells. The aim of this study was to confirm the possible role of arginine deiminase from *S. pyogenes* in inhibiting NO synthesis by macrophages. For this purpose, a comparative study was made of the effect on the synthesis of NO by macrophages of the products of destruction of two strains: the initial *S. pyogenes* M49-16 and the isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16 delArcA with the inactivated arginine deiminase gene (*arcA*). It has been shown that the ability of *S. pyogenes* M49-16 to inhibit production of NO by macrophages depends on its arginine deiminase activity because the isogenous mutant of *S. pyogenes* M49-16 delArcA with the inactivated gene *arcA* has lost its ability to inhibit NO synthesis. This allows us to consider the effects of *S. pyogenes* M49-16 as effects of arginine deiminase. An analysis of the inhibitory mechanisms of the enzyme showed that suppression of NO synthesis was not associated with the effect of destruction products of *S. pyogenes* M49-16 on the viability of macrophages. According to data of flow cytometry, incubation of cells in the presence of *S. pyogenes* destruction products of the original and mutant strains did not affect the level of iNOS expression, i.e. did not alter synthesis or stability of this enzyme. At the same time, the decrease in NO production under the influence of the original *S. pyogenes* strain M49-16 correlated with a decrease in the content of arginine in the culture medium. When exogenous arginine to the culture medium was added, the effect of the original strain of the suppression of NO production was declined. This confirms that the depletion of arginine is the main mechanism of the inhibitory effect of arginine deiminase on the production of NO by macrophages. The deficiency of NO production in the course of streptococcal infection can lead to a weakening of bactericidal activity of macrophages and to a decrease in the effectiveness of antimicrobial protection.

Key words: *S. pyogenes*, macrophages, arginine deiminase, NO, iNOS.

Введение

Фагоцитирующие клетки образуют первую линию защиты организма от патогенных микроорганизмов, проникающих через кожу или слизистые оболочки. Макрофаги — особый тип фагоцитирующих клеток, которые не только осуществляют элиминацию патогенов, но также обеспечивают презентацию фагоцитированных объектов, формирование антиген-специфических клонов лимфоцитов и иммунологической памяти. Защитная роль макрофагов при стрептококковой инфекции была показана в исследованиях с искусственным удалением макрофагов из организма мышей, после которого наблюдали усиление диссеминации бактерий и повышение частоты гибели зараженных животных [11, 12].

S. pyogenes в большинстве случаев не способны пролиферировать внутри клеток, и происходит элиминация патогена с участием процессов аутофагии и эндолизосомной гибели бактерий. Вместе с тем *S. pyogenes* вооружены разнообразными механизмами агрессии, значительная часть которых направлена на предупреждение слияния фагосомы и лизосомы, препятствие закислению среды внутри фагосомы, нарушение продукции бактерицидных молекул [4, 6, 13, 14, 21, 23]. Наиболее вирулентные штаммы

стрептококка могут длительно выживать внутри макрофагов, которые при этом обеспечивают их защиту от других иммунных механизмов элиминации и от действия антибиотиков. Возможность пролиферации *S. pyogenes* в живых макрофагах человека на уровне клеточной популяции и на уровне отдельных клеток была убедительно показана в исследовании O'Neill [19]. Norrby-Neglund et al. выявляли живые *S. pyogenes* в макрофагах из биоптатов от больных с инвазивной инфекцией, у которых бактериальная нагрузка возрастала на фоне внутривенной антибиотикотерапии [5]. Очевидно, вирулентные штаммы *S. pyogenes* имеют механизмы устойчивости к действию бактерицидных факторов макрофагов.

Одним из факторов *S. pyogenes*, способных ослаблять фагоцитарную активность клеток иммунной системы является аргининдеиминаза (АД). Этот бактериальный фермент осуществляет гидролиз аргинина с образованием аммиака, что препятствует закислению среды в фаголизосомах. В предшествовавших исследованиях в нашей лаборатории было показано, что продукты разрушения *S. pyogenes* M49-16 оказывали ингибирующее действие на продукцию NO в культуре мышинных перитонеальных макрофагов [1]. Предположительно, активность АД ограничивает биодоступность аргинина для

iNOS и синтез NO — важнейшего фактора бактерицидности макрофагов. Все это в совокупности может способствовать внутриклеточному персистенции патогена. Для подтверждения возможной роли АД в ингибировании синтеза NO был сконструирован мутантный штамм *S. pyogenes* с инактивированным геном АД [2].

Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение влияния на синтез NO продуктов разрушения двух штаммов: исходного *S. pyogenes* M49-16 и мутантного *S. pyogenes* M49-16 delArcA с инактивированным геном АД (*arcA*).

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном АД, утратившего способность синтезировать АД *S. pyogenes* M49-16 delArcA, любезно предоставленные проф. А.Н. Суворовым (отдел молекулярной микробиологии, ФГБНУ ИЭМ, Санкт-Петербург). Супернатанты разрушенных стрептококков (СРС) готовили, как описано в [2].

Мыши, культуры клеток и культуральные среды. Мыши СВА/BALB (F1) из питомника «Рапполово» содержались в условиях неограниченного доступа воды и пищи, в соответствии с принятыми этическими нормами. Клетки перитонеального лаважа получали методом промывания брюшной полости мышей стерильным раствором Хенкса. Клетки вносили в 96-ти луночный планшет (Eppendorf, РФ) в количестве 300 тысяч в 100 мкл среды RPMI 1640 (Биолот, РФ) с 10% телячьей фетальной сывороткой (Flow laboratories, США), с добавлением 2 мМ глутамин (Биолот, РФ), 50 мкг/мл гентамицин (Биолот, РФ), инкубировали 24 ч при температуре 37°C, 5% CO₂.

Клетки перевиваемой линии J774 (полученной из культуры макрофагов мышей Balb/c) культивировали в среде DMEM с повышенным содержанием глюкозы (Sigma, США), с добавлением глутамин 2 мМ (ICN, США), 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Германия), 50 мкг/мл гентамицин (АО «Самсон», РФ). Дезинтеграцию монослоя осуществляли путем инкубации клеток в растворе Версена (Биолот, РФ). Клетки переносили в 96-луночный планшет (Eppendorf, РФ) в количестве 200 тыс. в 100 мкл среды на одну лунку, затем инкубировали 24 ч при температуре 37°C, 5% CO₂.

Определение концентрации аргинина в среде после культивирования клеток в присутствии СРС. За основу метода определения аргинина была взята модифицированная реакция Сукагучи для колориметрического определения аргинина, основанная на образовании окрашенного в красный цвет соединения при реакции аргинина

с 8-оксихинолином и гипобромитом натрия в щелочной среде [24]. Для анализа к 100 мкл пробы, содержащей культуральную среду (100, 50 либо 25%), добавляли 50 мкл 5 мМ 8-оксихинолина и 100 мкл 8 мМ гипобромита натрия, растворенных в 2 М NaOH. В качестве контрольной пробы использовали PBS. Реакцию проводили в 96-луночных микропланшетах и регистрировали оптическую плотность с помощью планшетного спектрофотометра ClarioStar (BMG Labtech, Германия) при 505 нм. Для каждого эксперимента строили калибровочный график зависимости поглощения при 505 нм от концентрации аргинин-гидрохлорида (диапазон 4–500 мкМ) в PBS. Расчет концентрации аргинина в пробах проводили с помощью программного обеспечения Mars прибора ClarioStar, учитывая объемную долю культуральной среды в анализируемой пробе.

Определение концентрации нитритов и нитратов. После смены культуральной среды к клеткам вносили супернатанты разрушенных стрептококков в разных концентрациях. Для стимуляции продукции NO в лунки вносили LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 1 мкг/мл. В целях создания избытка субстрата в некоторые лунки добавляли L-аргинин (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 2 мМ. После 24-часовой инкубации при 37°C и 5% CO₂ клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 200g. После этого отбирали по 70 мкл надосадка, переносили в 96-луночный планшет (Eppendorf, РФ) и добавляли 70 мкл реактива Грисса. Спектрометрический анализ проводили при длине волны 540 нм (Microplate reader, Model 680, Bio-Rad). Концентрацию нитритов и нитратов в экспериментальных пробах определяли математически, в соответствии с линейной аппроксимацией по методу наименьших квадратов, на основании калибровочной кривой, построенной с использованием раствора нитрита натрия (NaNO₂) известной концентрации.

Анализ доли клеток в состоянии апоптоза и некроза. После 24-часовой инкубации клеток в присутствии разных концентраций СРС проводили дезинтеграцию монослоя, для чего в каждую лунку добавляли 25 мкл на лунку фермента аккутаза (Sigma-Aldrich, Германия) и инкубировали 3–10 мин при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл раствора Версена (Биолот, РФ) и переносили в микропробирки. Для инактивации аккутазы в каждую пробу вносили по 500 мкл полной культуральной среды и центрифугировали 5 мин при 200 g, надосадок удаляли и вносили пропидий-йодид (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 1 мкг/мл и YO-PRO (Invitrogen, США) в концентрации 250 нМ (Sigma-Aldrich,

Германия). Анализ образцов проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США).

Анализ экспрессии iNOS клетками линии J774. После 24-часовой инкубации в присутствии СРС клетки линии J774 переносили в пробирки, центрифугировали при 200 g, в течение 7 мин. Клетки фиксировали и пермеабилizировали в 500 мкл ледяного 80% р-ра метанола (Вектон, РФ) в течение 10 мин при -20°C . После однократной отмывки от метанола производили окрашивание клеточной суспензии с помощью моноклональных антител против iNOS мыши, меченных FITC (BD Transduction Laboratories, Cat. No. 610330), в соответствии с рекомендациями производителя. Анализ образцов проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). Результаты выражали средними значениями интенсивности флуоресценции (Mean Fluorescence Intensity — MFI).

Статистическая обработка. Все эксперименты повторяли как минимум трижды. Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 5.0 при помощи t-теста Стьюдента для независимых выборок.

Результаты

Предварительно проводили подбор концентрации, в которой СРС *S. pyogenes* M49-16 обладали максимальной способностью гидролизовать аргинин и максимальной ингибирующей

активностью в отношении продукции NO клетками линии J774. Для этого оценивали количество аргинина и его метаболита — NO в пробах при инкубации с различными концентрациями СРС исходного штамма (рис. 1А). СРС исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 достоверно дозозависимо снижал концентрацию аргинина в культуральной среде и достоверно подавлял продукцию NO макрофагами. Максимально эффект был выражен при разведении 1:100 (v/v) — СРС:культуральная среда. СРС *S. pyogenes* M49-16 delArcA такими эффектами не обладал (рис. 1Б). Для дальнейшей работы было выбрано разведение СРС:культуральная среда = 1:100 (v/v), так как в этом случае наблюдалось максимальное снижение продукции NO клетками и достоверное снижение количества аргинина в среде.

Чтобы убедиться, что снижение продукции NO клетками не является результатом их гибели, проводили анализ влияния исследуемых факторов на жизнеспособность клеток линии J774. Не было выявлено достоверных изменений суммарной доли клеток в состоянии апоптоза и некроза после инкубации в присутствии СРС в концентрациях 1/500, 1/100 и 1/50 (табл.).

Исследования показали, что СРС *S. pyogenes* M49-16 в разведениях 1/100 достоверно подавлял индуцированную ЛПС продукцию NO клетками линии J774 ($p < 0,0001$), а в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 delArcA продукция NO достоверно не изменялась (рис. 2). Добавление экзо-

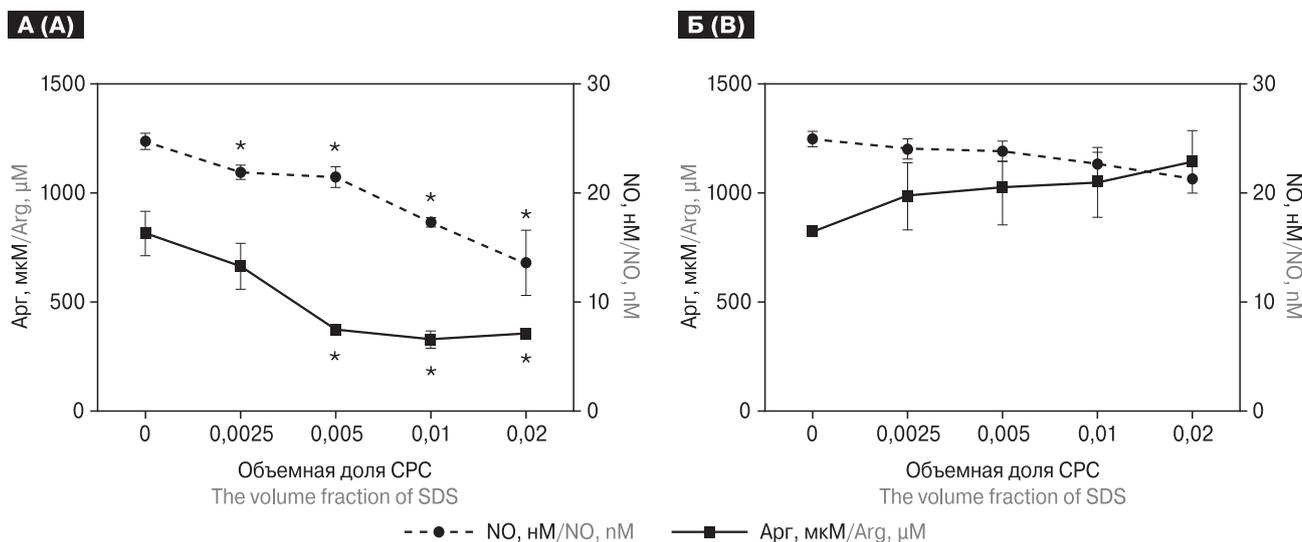


Рисунок 1. Концентрация аргинина и NO в культуральной среде при инкубации клеток J774 в присутствии разных разведений СРС *S. pyogenes*

Figure 1. The concentration of arginine and NO in the culture medium with the incubation of J774 cells in the presence of different dilutions of the SDS *S. pyogenes*

А — СРС исходного штамма (*S. pyogenes* M49-16), Б — СРС мутантного штамма (*S. pyogenes* M49-16 delArcA).

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня при $p < 0,05$.

А — SDS of the original strain (*S. pyogenes* M49-16), Б — SDS of the mutant strain (*S. pyogenes* M49-16 delArcA).

* — statistically significant differences from the control level at $p < 0.05$.

Таблица. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16 и M49-16 delArcA на жизнеспособность клеток линии J774
 Table. Effect of the SDS *S. pyogenes* M49-16 and M49-16 delArcA on the viability of J774 line cells

CPC <i>S. pyogenes</i> SDS <i>S. pyogenes</i>	Суммарная доля клеток в состоянии некроза и апоптоза (M±m, %, N = 3) при инкубации в присутствии CPC в разведении: The total proportion of cells in the state of necrosis and apoptosis (M±m, %, N = 3) when incubated in the presence of SDS in the dilution:			
	0	1/500	1/100	1/50
M49-16	14,02±1,38	13,76±2,20	13,66±0,69	12,70±0,76
M49-16 delArcA	14,02±1,38	14,93±2,24	13,60±0,98	14,60±0,85

генного аргинина в концентрации 2 мМ приводило к повышению подавленной супернатантом *S. pyogenes* M49-16 продукции NO более чем в 3 раза ($p < 0,0001$). При добавлении аргинина к клеткам в контроле уровень продукции NO повышался на 30%, так же, как при добавлении аргинина к клеткам, инкубированным в присутствии CPC M49-16 delArcA ($p < 0,05$).

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния CPC и экзогенного аргинина на продукцию NO клетками перитонеального лаважа. В этом случае при культивировании клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* M49-16 происходило достоверное снижение индуцированной под влиянием LPS продукции NO ($p < 0,05$). CPC *S. pyogenes* M49-16 delArcA не оказывал достоверного влияния на продукцию NO клетками перитонеального лаважа, индуциро-

ванную под действием LPS. Добавление экзогенного аргинина приводило к достоверному увеличению продукции NO более чем в 3 раза по сравнению с продукцией NO в присутствии *S. pyogenes* M49-16 ($p < 0,05$) (рис. 3).

Для уточнения механизма подавления продукции NO в присутствии CPC исходного штамма проводили анализ уровня экспрессии iNOS — фермента, который осуществляет синтез NO в макрофагах. Инкубация клеток в присутствии CPC как исходного, так и мутантного штаммов не приводило к изменению уровня экспрессии iNOS (рис. 4А). Добавление в культуральную среду аргинина также не влияло на уровень экспрессии данного фермента (рис. 4Б). Таким образом, подавление синтеза NO под влиянием АД не было связано с влиянием CPC на синтез либо стабильность iNOS.

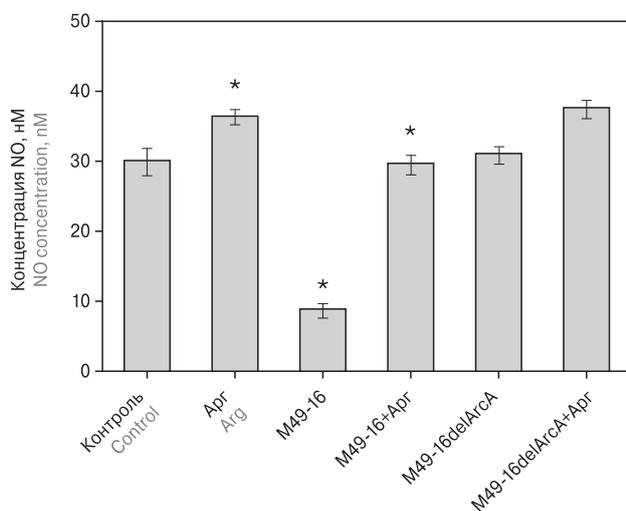


Рисунок 2. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA и 2 мМ экзогенного аргинина на продукцию NO клетками линии J774, индуцированную 1 мкг/мл LPS

Figure 2. The effect of SDS *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA and 2 mM exogenous arginine on the J774 cells NO production induced by 1 µg/ml LPS

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня, при $p < 0,05$.

* — statistically significant differences from the control level, with $p < 0.05$.

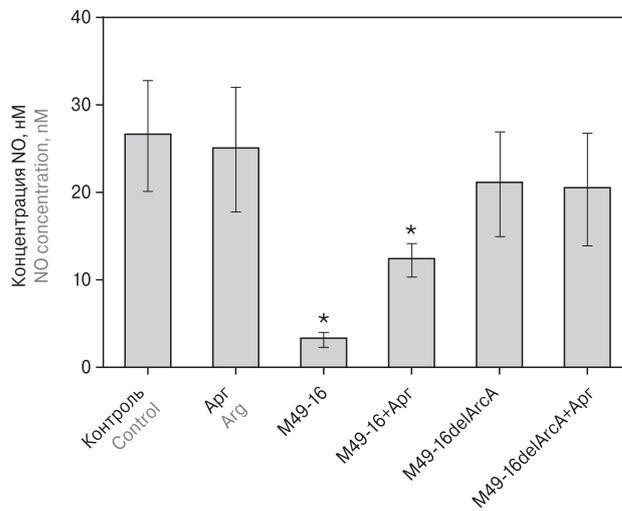


Рисунок 3. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA и 2 мМ экзогенного аргинина на продукцию NO клетками перитонеального лаважа, индуцированную 1 мкг/мл LPS

Figure 3. The Effect of SDS *S. pyogenes* M49-16, *S. pyogenes* M49-16 delArcA and 2 mM exogenous arginine on the peritoneal exudate cells NO production induced by 1 µg/ml LPS

* — статистически достоверные отличия от контрольного уровня, при $p < 0,05$.

* — statistically significant differences from the control level, with $p < 0.05$.

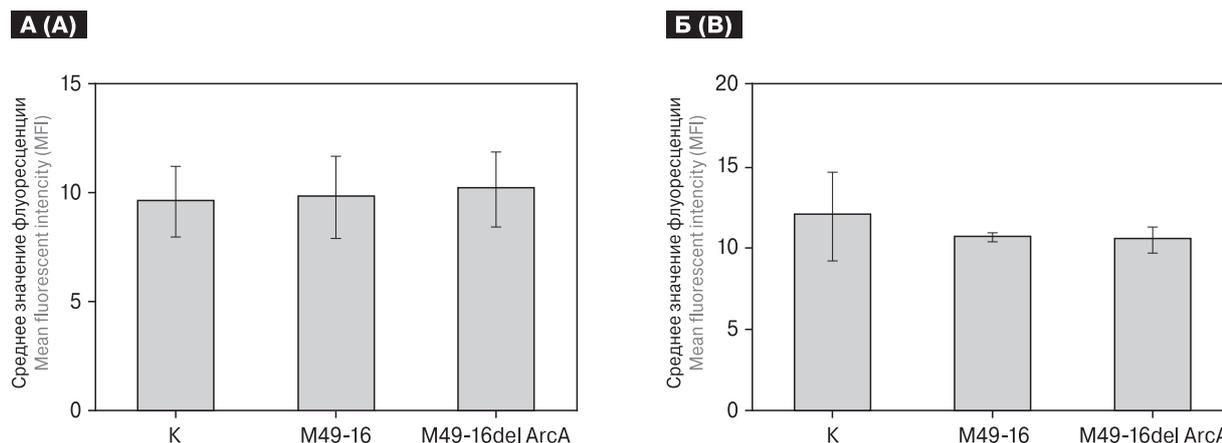


Рисунок 4. Влияние CPC *S. pyogenes* M49-16 и *S. pyogenes* M49-16 delArcA на уровень индуцированной LPS экспрессии iNOS клетками J774

Figure 4. The effect of SDS *S. pyogenes* M49-16 and *S. pyogenes* M49-16 delArcA on LPS-induced iNOS expression by J774 cells

К — контроль (1 мкг/мл LPS), M49-16 — исходный штамм, M49-16 delArcA — мутантный штамм. А) Без добавления аргинина. Б) С добавлением 2 мМ аргинина.

K — control (1 µg/ml LPS), M49-16 — original strain, M49-16 delArcA — mutant strain. A) Without arginine. B) With 2 mM arginine.

Обсуждение

В метаболизме аргинина у пиогенного стрептококка участвуют 3 ключевых фермента: аргининдеиминаза, орнитинкарбомуилтрансфераза и карбаматкиназа. Аргинин транспортируется внутрь клетки, катаболизируется перечисленными ферментами с образованием одной молекулы CO₂, одной молекулы АТФ и двух ионов аммония (NH₄⁺). За счет продукции аммония система ферментов АД выполняет защитную функцию [3, 8], а за счет продукции АТФ — энергетическую. При этом АД использует аргинин в качестве субстрата, вызывая его дефицит. Защитная роль макрофагов тесно связана с продукцией этими клетками бактерицидных молекул, в ряду которых важное место занимает NO. Аргинин служит субстратом для продукции NO при участии индуцибельной NO синтазы (iNOS) [17]. Синтез и активность iNOS регулируются доступностью субстрата (аргинина) в межклеточном пространстве [16, 20]. Кроме того, макрофаги продуцируют аргиназу — другой фермент, также использующий аргинин в качестве субстрата [7, 10]. Синтез iNOS и аргиназы в клетках регулируется реципрокно [16, 20]. Многие микроорганизмы используют этот регуляторный механизм, индуцируя продукцию аргиназы организма хозяина или синтезируя собственные, метаболизирующие аргинин ферменты [7, 10]. Наши исследования показали, что CPC исходного штамма *S. pyogenes* M49-16 ингибировал продукцию NO макрофагами как в первичной культуре клеток перитонеального лаважа мышей, так и в перевиваемой культуре клеток J774. Было показано, что способность CPC *S. pyogenes* инги-

бировать продукцию макрофагами оксида азота (NO) зависит от его аргининдеиминазной активности, так как изогенный мутант *S. pyogenes* M49-16delArcA с инактивированным геном АД утратил способность ингибировать синтез NO. Это позволяет рассматривать изученные нами эффекты CPC *S. pyogenes* M49-16 как эффекты фермента АД. Отмеченное снижение продукции NO макрофагами является результатом истощения запасов аргинина в среде, вызванной стрептококковой АД. В пользу этого говорят результаты экспериментов с параллельным измерением в культуральной среде клеток J774 уровней NO и аргинина. Максимальное снижение продукции NO коррелировало с достоверным снижением содержания аргинина. А при добавлении в культуральную среду клеток J774 одновременно с CPC экзогенного аргинина ингибирующее действие CPC исходного штамма существенно нивелировалось. Это также подтверждает, что именно истощение запасов аргинина является основным механизмом ингибирующего действия АД на продукцию NO макрофагами.

Полученные в нашем исследовании результаты согласуются с данными литературы. Так, ранее было показано, что в присутствии исходного штамма *S. pyogenes* HSC5 был зарегистрирован достоверно более низкий уровень продукции NO клетками линии RAW 264.7 по сравнению с уровнем продукции NO у клеток, культивируемых в присутствии изогенного мутанта с делецией гена АД [9]. При моделировании подкожной стрептококковой инфекции у мышей было показано, что в первые сутки после заражения повышается уровень экспрессии гена iNOS в клетках, но дефицит аргинина,

вызванный активностью АД, приводил к снижению продукции NO [9]. Аналогичные данные были получены при изучении влияния на продукцию NO АД, выделенной из микоплазмы [18, 22], когда было показано, что фермент снижал активность iNOS за счет быстрого истощения запасов аргинина в среде. В наших экспериментах было показано, что уровень экспрессии фермента iNOS клетками J774, индуцированной LPS, при инкубации в присутствии СРС обоих изученных штаммов *S. pyogenes* не изменялся. Таким образом, подавление синтеза NO не было связано с влиянием СРС на синтез или стабильность iNOS. Эти данные частично согласуются с результатами других исследователей [9, 11].

Проведено сравнительное исследование влияния на продукцию NO в культуре макрофагов СРС двух штаммов *S. pyogenes*: исходного М49-16 и мутантного М49-16 delArcA с инактивированным геном *arcA*, лишённого способности синтезировать АД. Доказано, что действие АД в составе СРС *S. pyogenes* М49-16, ингибирующее продукцию NO, не было связано ни с гибелью клеток, ни с изменением экспрессии iNOS, но нивелировалось при добавлении экзогенного аргинина. Недостаток продукции NO при стрептококковой инфекции может приводить к ослаблению бактерицидности макрофагов и к снижению эффективности противомикробной защиты.

Список литературы/References

1. Головин А.С., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на бактерицидную активность макрофагов // Медицинский академический журнал. 2016. Т. 16, № 4. С. 152. [Golovin A.S., Starikova E.A., Freidlin I.S. Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on the bactericidal activity of macrophages. *Meditsinskii akademicheskii zhurnal = Medical Academical Journal*, 2016, vol. 16, no. 4, p. 152. (In Russ.)]
2. Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бурова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* М49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 // Медицинская иммунология. 2016. Т. 18, № 6. С. 559–566. [Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. A role of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* М49-16 in promoting infection and inhibition of endothelial cell proliferation. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 555–562. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562 (In Russ.)]
3. Abdelal A.T. Arginine catabolism by microorganisms. *Annual Rev. Microbiol.*, 1979, vol. 33, no. 1, pp. 139–168. doi: 10.1146/annurev.mi.33.100179.001035
4. Barnett T.C., Liebl D., Seymour L.M., Gillen Ch.M., Lim J.Y., LaRock Ch.N., Davies M.R., Schulz B.L., Nizet V., Teasdale R.V., Walker M.J. The globally disseminated MIT1 clone of group A streptococcus evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe*, 2013, vol. 14, iss. 6, pp. 675–682. doi: 10.1016/j.chom.2013.11.003
5. Basma H., Norrby-Teglund A., Guedez Y., McGeer A., Low D.E., El-Ahmedy O., Schwartz B., Kotb M. Risk factors in the pathogenesis of invasive group A streptococcal infections: role of protective humoral immunity. *Infect. Immun.*, 1999, vol. 67, no. 4, pp. 1871–1877.
6. Bastiat-Sempe B., Love J.F., Lomayeva N., Wessels M.R. Streptolysin O and NAD-glycohydrolase prevent phagolysosome acidification and promote group A *Streptococcus* survival in macrophages. *MBio*, 2014, vol. 5, no. 5, pp. 1–11. doi: 10.1128/mBio.01690-14
7. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5, pp. 641–654. doi: 10.1038/nri1668
8. Cotter P.D., Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, vol. 67, no. 3, pp. 429–453. doi: 10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003
9. Cusumano Z.T., Watson M.E., Caparon M.G. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 1, pp. 233–242. doi: 10.1128/IAI.00916-13
10. Das P., Lahiri A., Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog.*, 2010, vol. 6, iss. 6: e1000899. doi: 10.1371/journal.ppat.1000899
11. Goldmann O., von Kockritz-Blickwede M., Holtje C., Chhatwal G.S., Geffers R., Medina E. Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infect. Immun.*, 2007, vol. 75, no. 8, pp. 4148–4157. doi: 10.1128/IAI.00181-07
12. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2956–2963. doi: 10.1128/IAI.72.5.2956-2963.2004
13. Lin A.E., Beasley F.C., Keller N., Hollands A., Urbano R., Troemel E.R., Hoffman H.M., Nizet V. A group A *Streptococcus* ADP-ribosyltransferase toxin stimulates a protective interleukin 1 β -dependent macrophage immune response. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 2, pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.00133-15
14. Lu S.-L., Kuo C.-F., Chen H.-W., Yang Y.-S., Liu C.-C., Anderson R., Wu J.-J., Lin Y.-S. Insufficient acidification of autophagosomes facilitates group A streptococcus survival and growth in endothelial cells. *MBio*, 2015, vol. 6, no. 5, pp. 1–12. doi: 10.1128/mBio.01435-15
15. Mishalian I., Ordan M., Peled A., Maly A., Eichenbaum M.B., Ravins M., Aychek T., Jung S., Hanski E. Recruited macrophages control dissemination of group A *Streptococcus* from infected soft tissues. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, iss. 11, pp. 6022–6031. doi: 10.4049/jimmunol.1101385
16. Mori M. Regulation of nitric oxide synthesis and apoptosis by arginase and arginine recycling. *J. Nutr.*, 2007, vol. 137, iss. 6, pp. 1616S–1620S.
17. Nathan C., Shiloh M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 16, pp. 8841–8848. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

18. Noh E.J., Kang S.W., Shin Y.J., Kim D.C., Park I.S., Kim M.Y., Chun B.G., Min B.H. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in *E. coli* and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. *Mol. Cells*, 2002, vol. 13, no. 1, pp. 137–143.
19. O'Neill A.M., Thurston T.L.M., Holden D.W. Cytosolic replication of group A streptococcus in human macrophages. *MBio*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 1–16. doi: 10.1128/mBio.00020-16
20. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2, pp. 75–93. doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007
21. Sakurai A., Maruyama F., Funao J., Nozawa T., Aikawa Ch., Okahashi N., Shintani S., Hamada Sh., Ooshima T., Nakagawa I. Specific behavior of intracellular streptococcus pyogenes that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 29, pp. 22666–22675. doi: 10.1074/jbc.M109.100131
22. Shen L.-J., Lin W.C., Beloussow K., Hosoya K., Terasaki T., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a differential modulator of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthetase activity in cultured endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, vol. 66, no. 10, pp. 1945–1952. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00555-0
23. Timmer A.M., Timmer J.C., Pence M.A., Hsu L.-C., Ghochani M., Frey T.G., Karin M., Salvesen G.S., Nizet V. Streptolysin O promotes group A streptococcus immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 2, pp. 862–871. doi: 10.1074/jbc.M804632200
24. Wang H., Liang X.H., Zhao R.X., Feng L.D., Li H. Spectrophotometer determination of arginine in grape juice using 8-hydroquinoline. *Agr. Sci. China*, 2008, vol. 7, no. 10, pp. 1210–1215. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60166-2

Авторы:

Старикова Э.А., к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Соколов А.В., д.б.н., зав. лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

Бурова Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Головин А.В., аспирант отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Лебедева А.М., к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

Васильев В.Б., д.м.н., зав. отделом молекулярной генетики ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия;

Фрейдлин И.С., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Sokolov A.V., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Biochemical Genetics, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Golovin A.S., PhD Student, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Lebedeva A.M., PhD (Biology), Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation;

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Professor, RAS Corresponding Member, Main Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.10.2017
Отправлена на доработку 07.05.2018
Принята к печати 30.05.2018

Received 31.10.2017
Revision received 07.05.2018
Accepted 30.05.2018

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ВИРУСНЫЕ ПАТОГЕНЫ В КЛЕЩАХ *IXODES* sp. НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.А. Панферова¹, М.А. Суворова², А.О. Шапарь³, Н.К. Токаревич^{1,4}

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

² ООО «Эксплана», Санкт-Петербург, Россия

³ Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора г. Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Клещевые инфекции являются самой распространенной группой зооантропонозных заболеваний в Северном полушарии. Для региона Балтийского моря и Фенноскандии доминирующими инфекционными патологиями являются иксодовый клещевой боррелиоз и вирусный клещевой энцефалит. Наличие обширных облесенных территорий, активно посещаемых людьми в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, способствует достаточно высокому уровню покусанности клещами и распространению ВКЭ и ИКБ среди населения данных регионов. Определенную опасность представляют и относительно малоизученные патогены, которые могут переноситься с укусом клеща: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. В данной работе была проведена детекция с помощью молекулярно-генетических методов ВКЭ, боррелий комплекса *B. burgdorferi sensu lato* и *Rickettsia* sp. в клещах, снятых с людей, а также голодных клещей, собранных с растительности. Установленные уровни инфицирования ВКЭ у напитавшихся клещей превышают таковые у голодных клещей, уровни пораженности патогенными боррелиями голодных и напитавшихся клещей оказались примерно равными. Риккетсии в напитавшихся клещах не были обнаружены. Проведен анализ распространенности патогенов в сравнении с данными отечественных и западных авторов. Мониторинг за распространением клещевых патогенов в очагах является важным направлением в профилактике инфекций, передаваемых с укусом клеща, на северо-западе России.

Ключевые слова: клещевые патогены, вирус клещевого энцефалита, боррелии, риккетсии, инфицированность, ПЦР-диагностика.

BACTERIAL AND VIRAL PATHOGENS IN *IXODES* SP. TICKS IN ST. PETERSBURG AND LENINGRAD DISTRICT

Panferova Yu.A.^a, Suvorova M.A.^b, Shapar' A.O.^c, Tokarevich N.K.^{a,d}

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

^b Explana JSC, St. Petersburg, Russian Federation

^c Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Tick-borne infections are the most common group of zoonotic diseases in the Northern Hemisphere. For the Baltic Sea region and Fennoscandia, the dominant infectious pathologies transmitted by ticks are tick-borne borreliosis and tick-borne encephalitis. The presence of vast forested areas, actively visited by people in St. Petersburg and the Leningrad region, contributes to a rather high level of encroachment on the flares and intelligence of the borreliosis and tick-borne encephalitis among the population of these regions. The relatively dangerous pathogens that can be transmitted with the tick

Адрес для переписки:

Панферова Юлия Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: (812) 232-21-36 (служебн.).
Факс: (812) 233-20-92.
E-mail: ersvart@inbox.ru

Contacts:

Yulia A. Panferova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-21-36 (office).
Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: ersvart@inbox.ru

Библиографическое описание:

Панферова Ю.А., Суворова М.А., Шапарь А.О., Токаревич Н.К.
Бактериальные и вирусные патогены в клещах *Ixodes* sp. на территории
Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Инфекция и иммунитет.
2018. Т. 8, № 2. С. 219–222. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-219-222

Citation:

Panferova Yu.A., Suvorova M.A., Shapar' A.O., Tokarevich N.K. Bacterial and
viral pathogens in *Ixodes* sp. ticks in St. Petersburg and Leningrad district //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018,
vol. 8, no. 2, pp. 219–222. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-219-222

bite are also of particular danger: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. In this work, detection was performed using molecular genetic methods of TBE virus, *B. burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. in engorged ticks, as well as questing ticks collected from vegetation. The established levels of infection of TBE on infected ticks, levels of infection by pathogenic *Borrelia* of questing and engorged ticks were approximately equal. *Rickettsia* was not found in the ticks. The conducted analysis of the pathogens prevalence in comparison with the data of Russian and foreign authors. Monitoring the prevalence of tick-borne pathogens is an important issue in the prevention of tick-borne infections in the North-Western Russia.

Key words: tick-borne pathogens, tick-borne encephalitis virus, *Borrelia* sp., *Rickettsia* sp., infectivity rate, PCR detection.

Клещи и клещевые патогены являются важной проблемой для общественного здравоохранения на многих территориях Евразии. Северо-запад России, включая мегаполис Санкт-Петербург и прилегающие районы, относится к территориям, эндемичным по клещевым инфекциям, наиболее распространенными из которых являются вирусный клещевой энцефалит и клещевой боррелиоз. Эпидемиологическое значение на указанных территориях имеют таежный клещ (*Ixodes persulcatus*) и лесной клещ (*I. ricinus*) [5]. Клещи могут быть заражены несколькими патогенами бактериальной и вирусной природы, опасными для человека [6]. Возбудители иксодового клещевого боррелиоза на данных территориях представлены видами *Borrelia burgdorferi* sensu lato [3, 13]. В настоящее время также установлена циркуляция иных бактериальных патогенов в иксодовых клещах на территории России и сопредельных государств — стран Балтийского региона и Фенноскандии: *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* sp. [13, 14, 17]. Возможность инфицирования иксодовых клещей несколькими микроорганизмами увеличивает риск развития микст-инфекции у людей после укуса клеща и требует комплексного подхода к диагностике и профилактике клещевых инфекций.

Цель исследования: проведение индикации ДНК бактериальных патогенов (*B. burgdorferi* sensu lato complex, *Rickettsia* sp.) в клещах, снятых с людей и с растительности, с использованием ПЦР и вируса клещевого энцефалита с использованием ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Материалы и методы

Были исследованы клещи рода *Ixodes* sp., снятые с людей, обратившихся в диагностический центр по поводу укуса клеща. Во всех случаях присасывание клещей отмечали при нахождении на территории Ленинградской области и Санкт-Петербурга. Голодные клещи собирались на тканевый флаг на территории лесопарковых зон Санкт-Петербурга. Клещей индивидуально гомогенизировали в 100 мкл стерильного физиологического раствора. Выделение РНК и ДНК производилось с использованием набора «АмплиПрайм Рибо-преп» («Некстбио», Москва, Россия) согласно инструкции. Обратная транскрипция производилась с использованием набора «Реверта L-100» («Интерлабсервис», Москва, Россия) согласно инструкции производителя, в качестве матрицы использовали

10 мкл элюированной смеси нуклеиновых кислот. В напитавшихся клещах для определения ДНК *B. burgdorferi* sensu lato complex проводилась ПЦР с праймерами, фланкирующими фрагмент гена *ospC*, F: AAAGAATACATTAAGTGCATATT и R: GGGCTTGTAAGCTCTTAACT [12]. Для определения ДНК *Rickettsia* sp. проводили ПЦР с праймерами, фланкирующими фрагмент гена *gltA*, F: ATGGCTATTATGCTTGC GG C и R: CAGAАCTACCGATTTCTTTAAGC [11]. Для определения ВКЭ проводилась ОТ-ПЦР с праймерами, фланкирующими регион 5'-нетранслируемой области, Pp1 GCGTTTGCTTCGGACAGCATTAGC и Pml: GCGTCTTCGTTGCGGTCTCTTTCG [4]. Голодных клещей анализировали с помощью наборов «Амплисенс» для детекции вируса клещевого энцефалита и *B. burgdorferi* sensu lato («Интерлабсервис», Москва, Россия) согласно инструкции производителя. На присутствие риккетсий голодных клещей не исследовали. Для определения геновида боррелий в напитавшихся клещах проводилось секвенирование полученных ампликонов фрагмента гена *ospC*. Секвенирование проводили с использованием набора реагентов «BigDye Terminator v3.1» согласно инструкции производителя на автоматическом анализаторе «MegaBace 1000» («GE Healthcare», США). Полученные сиквенсы сравнивали с запонированными в базе данных GeneBank с использованием алгоритма megablast (по состоянию базы на 10 сентября 2015 г.). Расчет доверительных интервалов производился в приложении EpiTools.

Результаты и обсуждение

Число голодных и снятых с людей клещей, инфицированных вирусом КЭ и боррелиями, представлено в таблице. Вирусофорность клещей, снятых с людей, ВКЭ составила 1% — 5 особей (доверительный интервал (ДИ) 95% 0,43–2,38). Присутствие ДНК *B. burgdorferi* sensu lato complex отмечено в 9,8% (у 48 особей) (95% ДИ 7,51–12,82). ДНК *Rickettsia* sp. в исследованных образцах не выявлена. Микст-инфекция ВКЭ и боррелиями не была обнаружена. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей гена *ospC* боррелий позволило установить, что все обнаруженные образцы принадлежат к геновиду *Borrelia afzelii*.

Средняя численность голодных клещей, собранных на флаг, за исследованный период составила 1,5. Для голодных клещей инфицированность ВКЭ составила 0,3% (95% ДИ 0,1–0,92%), боррелиями — 12,3% (95% ДИ 10,32–14,5).

Таблица. Инфицированность голодных клещей и клещей, снятых с людей, вирусом КЭ и возбудителями ИКБ

Table. Prevalence of TBE virus and Lyme borreliosis agent in questing ticks and ticks, removed from patients

Число исследованных клещей Number of examined ticks		Инфицировано ВКЭ Infested by TBEV	Инфицировано боррелиями Infested by <i>Borrelia</i> sp.
Голодные (на флаг)/Questing (flagged)	946	3	116
Напитавшиеся/Engorged	487	5	48

Вирусный клещевой энцефалит и иксодовый боррелиоз являются распространенными природно-очаговыми заболеваниями умеренных широт Северного полушария. Усиливающаяся антропогенная нагрузка на природные ландшафты и изменение климата обуславливают повышение риска укуса клещами и заражения вирусными и бактериальными инфекциями, данная ситуация является актуальной и для северо-западных регионов России [16]. Установлено наличие сочетанных природных очагов инфекций, переносимых клещами, на территории России [8]; помимо достаточно хорошо изученных патогенов (ВКЭ, возбудители иксодового боррелиоза), в них могут циркулировать другие микроорганизмы, вызывающие заболевания человека (эрлихии, анаплазмы, риккетсии). Структура так называемых новых бактериальных клещевых инфекций в северо-западных регионах России к настоящему моменту остается недостаточно изученной. В данной работе проведена оценка распространенности вирусных (ВКЭ) и бактериальных (*B. burgdorferi* s.l., *Rickettsia* sp.) патогенов в клещах, собранных на флаг и снятых с людей, на территории Ленинградской области и Санкт-Петербурга.

Было установлено, что вирусофорность напитавшихся клещей ВКЭ за исследованный период составляет 1%. Эта величина является средней в рамках выявленной в странах Балтийского региона вирусофорности голодных клещей [9, 10, 15] и несколько превышает средний по России показатель вирусофорности клещей, снятых с людей (0,76%) [2]. Доля инфицированных голодных клещей в зеленых зонах Санкт-Петербурга была почти в 3 раза ниже. По данным некоторых исследователей, инфицирование вирусом КЭ может приводить к более высокой активности клеща [1]; этим может объясняться более высокая инфицированность напитавшихся клещей по сравнению с голодными.

Возбудители иксодового клещевого боррелиоза обнаружены в 9,8% напитавшихся клещей и в 12,3% голодных. Установлена циркуляция геновида *B. afzelii* в клещах, снятых с людей, что свидетельствует об ассоциации инфициро-

ванных клещей с наземными прокормителями, являющимися хозяевами для данного геновида. Стоит отметить, что выявленная нами распространенность боррелий в иксодовых клещах является относительно невысокой по сравнению с данными других исследователей [13], в то время как средняя распространенность боррелий среди клещей в Европе составляет 18% [7]. Не была обнаружена микст-инфекция исследованных переносчиков боррелиями и ВКЭ. В нашем исследовании был обнаружен лишь один геновид боррелий, *B. afzelii*, хотя другие исследователи приводят данные о распространении в регионе Прибалтики и Фенноскандии и других геновидов комплекса *B. burgdorferi sensu lato* [15].

Достоверно значимых различий в значении инфицированности клещей возбудителями ВКЭ и ИКБ среди голодных и напитавшихся не выявлено. Это может быть связано с относительно небольшим объемом выборки. Для получения более значимых результатов целесообразно увеличение количества исследуемых объектов.

В нашем исследовании ДНК риккетсий в клещах, снятых с людей, не была обнаружена, что согласуется с данными, полученными другими исследователями ранее [6]; вероятно, данные патогены имеют меньшее значение в инфицировании населения на исследованной территории, что не отрицает возможности их циркуляции в природных очагах и передачи с укусом клеща. Данные нашего исследования по превалентности риккетсий отличаются от данных других исследований, проведенных в странах Балтийского региона, преимущественно на голодных клещах, где патогенные риккетсии были обнаружены в 1,1–9,6% иксодид [11, 14, 17], и других регионах СЗФО Российской Федерации, где риккетсии обнаруживались в 1,6–2,8% клещей [6]. Несмотря на отсутствие риккетсий группы пятнистых клещевых лихорадок в клещах, снятых с людей, дальнейшие исследования, направленные на исследование голодных клещей в северо-западном регионе России, имеют ценность в изучении биологии этих микроорганизмов, а также для рациональной диагностики и профилактики инфекций, вызываемых ими.

Список литературы/References

1. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В. Вирус клещевого энцефалита во внутренней среде клеща-переносчика: экологические аспекты // Бюллетень СО РАМН. 2007. Т. 27, № 4. С. 100–104. [Alekseev A.N., Dubinina E.V. Tick-borne encephalitis virus in the internal environment of the tick-vector: ecological aspects. *Byulleten' Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2007, vol. 27, no. 4, pp. 100–104. (In Russ.)]

2. Носков А.К., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Пакскина Н.Д., Яцменко Е.В., Веригина Е.В., Иннокентьева Т.И., Балахонov С.В. Клешевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. Т. 1. С. 37–43. [Noskov A.K., Nikitin A.Y., Andaev E.I., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V., Innokent'eva T.I., Balakhonov S.V. Tick-borne virus encephalitis in the Russian Federation: features of epidemic process in steady morbidity decrease period. Epidemiological condition in 2016 and the forecast for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, vol. 1, pp. 37–43. doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-37-43 (In Russ.)]
3. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Antykova L.P., Dzhivanyan T.I., Rijpkema S.G., Kruij N.V., Cinco M. Tick-borne borrelioses pathogen identification in Ixodes ticks (Acarina, Ixodidae) collected in St. Petersburg and Kaliningrad Baltic regions of Russia. *J. Med. Entomol.*, 1998, vol. 35, no. 2, pp. 136–142.
4. Bormane A., Zeltina A., Lucenko I., Mavcutko V., Duks A., Pujate E., Ranka R., Baumanis V. Tick-borne encephalitis — pathogen, vectors and epidemiological situation in Latvia 2002–2003. *Acta Univers. Latv.*, 2004, vol. 676, pp. 27–37.
5. Bugmyrin S., Bespyatova L., Korotkov Y., Burenkova L., Belova O., Romanova L., Kozlovskaya L., Karganova G., Ieshko E. Distribution of Ixodes ricinus and I. persulcatus ticks in southern Karelia (Russia). *Ticks Tick Borne Dis.*, 2013, vol. 4, iss. 1–2, pp. 57–62. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.07.004
6. Ereemeeva M.E., Oliveira A., Moriarity J., Robinson J.B., Tokarevich N.K., Antyukova L.P., Pyanyh V.A., Emeljanova O.N., Ignatjeva V.N., Buzinov R., Pyankova V., Dasch G.A. Detection and identification of bacterial agents in Ixodes persulcatus Schulze ticks from the north western region of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2007, vol. 7, pp. 426–436.
7. Hubalek Z., Halouzka J. Distribution of Borrelia burgdorferi sensu lato genomic groups in Europe. *Eur. J. Epidemiol.*, 1997, vol. 13, iss. 8, pp. 951–957. doi: 10.1023/A:1007426304900
8. Jaaskelainen A., Sironen T., Murueva G., Subbotina N., Alekseev A., Castran J., Alitalo I., Vaheri A., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis virus in ticks in Finland, Russian Karelia and Buryatia. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, no. 11, pp. 2706–2712. doi: 10.1099/vir.0.023663-0
9. Jaaskelainen A., Tonteri E., Sironen T., Pakarinen L., Vaheri A., Vapalahti O. European subtype tick-borne encephalitis virus in Ixodes persulcatus ticks. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 2, pp. 323–325. doi: 10.3201/eid1702.101487
10. Katargina O., Russakova S., Geller J., Kondrusik M., Zajkowska J., Zygutiene M., Bormane A., Trofimova J., Golovljova I. Detection and characterization of tick-borne encephalitis virus in Baltic countries and eastern Poland. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 5:e61374. doi: 10.1371/journal.pone.0061374
11. Katargina O., Geller J., Ivanova A., Varv K., Tefanova V., Vene S. Detection and identification of Rickettsia species in Ixodes tick populations from Estonia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2015, vol. 6, iss. 6, pp. 689–694. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.06.001
12. Kim C., Yi Y., Yu D., Lee M., Cho M., Desai A., Shringi S., Klein T., Kim H., Song J., Baek L., Chong S., O'Guinn M., Lee J., Lee I., Park J., Foley J., Chae J. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Envir. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 9, pp. 5766–5776. doi: 10.1128/AEM.00431-06
13. Korenberg E., Kovalevskii Y., Levin M., Shchyogoleva T. The prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes persulcatus and I. ricinus ticks in the zone of their sympatry. *Folia Parasitol.*, 2001, vol. 48, pp. 63–68.
14. Lindblom A., Wallmenius K., Sjowall J., Fryland L., Lindgren P., Forsberg P., Nollsson K. Prevalence of Rickettsia sp. in ticks and serological and clinical outcomes in tick-bitten individuals in Sweden and on the Aland islands. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 11: e0166653. doi: 10.1371/journal.pone.0166653
15. Sormunen J., Klemola T., Vesterinen E., Vuorinen I., Hytonen J., Hanninen J., Ruohomaki K., Saaksjarvi I., Tonteri E., Penttinen R. Assessing the abundance, seasonal questing activity and tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence of Ixodes ricinus ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Southwest Finland. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2016, vol. 7, iss. 1, pp. 208–215. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.011
16. Tokarevich N., Tronin A., Gnativ B., Revich B., Blinova O., Evengard B. Impact of air temperature variations on the ixodid ticks habitat and tick-borne encephalitis incidence in the Russian Arctic: the case of Komi Republic. *Int. J. Circumpolar. Health*, 2017, vol. 76, iss. 1: 1298882. doi 10.1080/22423982.2017.1298882
17. Wallmenius K., Pettersson J., Jaenson T., Nilsson K. Prevalence of Rickettsia sp., Anaplasma phagocytophilum and Coxiella burnetii in adult Ixodes ricinus ticks from 29 study areas in central and southern Sweden. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2012, vol. 3, iss. 2, pp. 100–106. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.11.003

Авторы:

Панферова Ю.А., младший научный сотрудник лаборатории зооантропонозных инфекций, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Суворова М.А., генеральный директор ООО «Эксплана», Санкт-Петербург, Россия;

Шапарь А.О., зав. отделом паразитологии, Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора г. Санкт-Петербурга, Санкт-Петербург, Россия;

Токаревич Н.К., д.м.н., профессор, зав. лабораторией зооантропонозных инфекций, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Panferova Yu.A., Junior Researcher, Laboratory of Zoonoses, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Suvorova M.A., General Manager, Explana JSC, St. Petersburg, Russian Federation;

Shapar A.O., Head of Parasitological Department, Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance, 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; Professor, Department of Epidemiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.02.2018
Отправлена на доработку 16.03.2018
Принята к печати 26.03.2018

Received 06.02.2018
Revision received 16.03.2018
Accepted 26.03.2018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВГЧ-6-ОПОСРЕДОВАННОГО ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ МЕТОДОМ ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА

Е.Н. Филатова¹, Л.А. Солнцев¹, Н.Б. Преснякова¹, Е.А. Кулова², О.В. Уткин^{1,2}

¹ ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

² ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский институт МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6) — лимфотропный вирус, являющийся этиологическим агентом инфекционного мононуклеоза (ИМ) у детей. ВГЧ-6-опосредованный инфекционный мононуклеоз (ВГЧ-6М) не имеет четко выраженных клинических особенностей. Иммунопатогенетические аспекты данного заболевания на сегодняшний день изучены не полностью. Целью настоящей работы явилось изучение особенностей количественного состава популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови детей с ВГЧ-6М. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови детей с диагнозом «инфекционный мононуклеоз», а также практически здоровых детей. В зависимости от этиологической причины заболевания дети с ИМ были разделены на три группы: ВГЧ-6М, ИМ иной этиологии и микст-инфекция (сочетание ВГЧ-6 и вируса Эпштейна–Барр и/или цитомегаловируса). Практически здоровые дети сформировали четвертую группу. В образцах крови методом проточной цитофлуориметрии определяли абсолютное содержание следующих популяций иммунокомпетентных клеток: общей популяции Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, дубль-позитивных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD8⁺), НК-клеток и В-лимфоцитов. На основе полученных данных о популяционном составе клеток крови проводили дискриминантный анализ — строили модель зависимости принадлежности ребенка к одной из четырех групп, анализируемых попарно. Применяли метод машинного обучения — алгоритм градиентного бустинга над решающими деревьями. При этом определяли, возможна ли классификация пациентов на основе изучаемых показателей и какая комбинация показателей является оптимальной для классификации. В результате исследования удалось классифицировать следующие пары групп: здоровые дети — дети с ВГЧ-6М, здоровые дети — дети с ИМ иной этиологии, дети с ВГЧ-6М — дети с ИМ иной этиологии. При решении задачи классификации детей с микст-инфекцией и детей любой другой группы не удалось найти модель удовлетворительного качества. По сравнению с практически здоровыми детьми, дети с ВГЧ-6М отличались повышенным содержанием общего пула Т-лимфоцитов и цитотоксических Т-клеток, а также пониженным содержанием дубль-позитивных Т-лимфоцитов. В отличие от детей с ИМ иной этиологии, дети с ВГЧ-6М характеризова-

Адрес для переписки:

Филатова Елена Николаевна
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-46 (служебн.).
Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniiem.ru

Contacts:

Elena N. Filatova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71, Blokhina Research Institute
of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-46 (office).
Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: filatova@nniiem.ru

Библиографическое описание:

Филатова Е.Н., Солнцев Л.А., Преснякова Н.Б., Кулова Е.А., Уткин О.В. Определение некоторых иммунологических особенностей ВГЧ-6-опосредованного инфекционного мононуклеоза у детей методом дискриминантного анализа // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 223–229. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-223-229

Citation:

Filatova E.N., Solntsev L.A., Presnyakova N.B., Kulova E.A., Utkin O.V. Determination of some immunological features of HHV-6-mediated infectious mononucleosis in children by the method of discriminatory analysis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 223–229. doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-223-229

лись повышенным содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов и пониженным количеством дубль-позитивных Т-клеток. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ВГЧ-6-опосредованный инфекционный мононуклеоз вызывает у детей изменения в количественном составе некоторых популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови, отличное от ИМ иной этиологии.

Ключевые слова: ВГЧ-6, инфекционный мононуклеоз, популяционный состав клеток крови, иммунитет, проточная цитометрия, градиентный бустинг.

DETERMINATION OF SOME IMMUNOLOGICAL FEATURES OF HHV-6-MEDIATED INFECTIOUS MONONUCLEOSIS IN CHILDREN BY THE METHOD OF DISCRIMINATORY ANALYSIS

Filatova E.N.^a, Solntsev L.A.^a, Presnyakova N.B.^a, Kulova E.A.^b, Utkin O.V.^{a,b}

^a Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Human herpesvirus type 6 (HHV-6) is a lymphotropic virus that is an etiological agent of infectious mononucleosis (IM) in children. HHV-6-mediated infectious mononucleosis (HHV-6M) does not have clearly defined clinical features. Nowadays immunopathogenetic aspects of this disease have not been fully understood. The purpose of this work was to study the characteristics of the quantitative composition of populations of immunocompetent cells of peripheral blood in children with HHV-6M. The material for the study was samples of peripheral blood from children with “infectious mononucleosis” diagnosis and from virtually healthy children. Depending on the etiologic cause of the disease, children with IM were divided into three groups: HHV-6M, IM of other etiology and mixed infection (combination of HHV-6 and Epstein–Barr virus and/or Cytomegalovirus). Virtually healthy children formed the fourth group. In blood samples, the absolute content of the following populations of immunocompetent cells was determined by the method of flow cytometry: the total population of T-lymphocytes, T-helpers, cytotoxic T-lymphocytes, double positive T-lymphocytes (CD4⁺CD8⁺), NK cells and B-lymphocytes. Discriminant analysis was carried out: based on the obtained data on the population composition of blood cells we constructed a model of a child’s attribution to one of the four groups analyzed in pairs. We used the method of machine learning — the algorithm of gradient boosting over decision trees. It was determined whether it is possible to classify patients on the basis of the studied indicators and which combination of indicators is optimal for classification. As a result of the study it was possible to classify the following pairs of groups: healthy children — children with HHV-6M, healthy children — children with IM of other etiology, children with HHV-6M — children with IM of other etiology. When solving the problem of classifying children from group with mixed infection and from any other group, it was not possible to find a model of satisfactory quality. In comparison with virtually healthy children, children with HHV-6M were characterized by an increased content of the total population of T-lymphocytes and cytotoxic T-cells, as well as by a reduced content of double-positive T-lymphocytes. Compared with children with IM of other etiology, children with HHV-6M were characterized by an increased content of cytotoxic T-lymphocytes, T-helpers, B-lymphocytes and a reduced number of double-positive T cells. Our results indicate that HHV-6-mediated infectious mononucleosis causes changes in the quantitative composition of certain populations of immunocompetent cells of peripheral blood, different from those of other etiology, in children.

Key words: HHV-6, infectious mononucleosis, population composition of blood cells, immunity, flow cytometry, gradient boosting.

Введение

Инфекционный мононуклеоз (ИМ) — широко распространенное заболевание, вызываемое вирусами семейства *Herpesviridae*. Латентными носителями вирусов являются 90% городского населения, однако острый инфекционный процесс развивается лишь у 10% инфицированных лиц, чаще всего — у детей и подростков. В настоящее время хорошо изучены особенности течения ИМ, обусловленного вирусом Эпштейна–Барр. При этом в этиологической структуре заболевания ИМ, вызванный вирусом герпеса человека 6 типа (ВГЧ-6М), занимает 20%, а в сочетании с микст-инфекцией — до 40%. Клиническая

картина ВГЧ-6М принципиально не отличается от ВЭБ-опосредованного, что затрудняет его диагностику [1].

Известно, что ВГЧ-6 является лимфотропным вирусом. Он обладает повышенным тропизмом к CD4⁺ Т-лимфоцитам и моноцитам, ограниченно реплицируется в CD8⁺ Т-клетках, В-лимфоцитах, НК-клетках и макрофагах [2]. Как и при ВЭБ-опосредованном ИМ, иммунный ответ при ВГЧ-6М включает в себя усиление воспалительных реакций, активацию В-клеточного звена иммунного ответа и продукции антител, активацию Т-лимфоцитов и НК-клеток [5]. Отличительные иммунологические особенности течения ВГЧ-6М на сегодняшний день изучены недостаточно.

Анализ взаимосвязи в изменениях иммунного статуса пациента с этиологической картиной заболевания, стадией развития либо характером течения инфекционного процесса — сравнительно трудная задача. Сложность проблемы обусловлена наличием тесной ассоциации и кооперации между компонентами иммунной системы, зависимостью их функций от регуляторных сигналов со стороны нервной и эндокринной систем, а также индивидуальных характеристик организма. Чаще всего не удается выявить единственный патогномический «иммунологический маркер» заболевания и следует рассматривать несколько взаимосвязанных параметров в комплексе. Для решения задач подобного типа целесообразно применять дискриминантный анализ методами машинного обучения (обучения с учителем), позволяющими идентифицировать паттерн факторов, взаимодействие которых приводит к конкретному результату.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей количественного состава популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови детей с ВГЧ-6-опосредованным инфекционным мононуклеозом.

Материалы и методы

Получение и подготовка данных. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови детей 7–13 лет с диагнозом «Острый инфекционный мононуклеоз». Забор материала производили после получения информированного согласия родителей или опекунов. С помощью коммерческого набора «АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) в исследуемых образцах крови определяли содержание трех вирусов-возбудителей ИМ: вируса Эпштейна–Барр, цитомегаловируса и ВГЧ-6. В зависимости от полученных результатов детей с ИМ разделяли на группы: группа 1 — в крови пациентов выявлялась только ДНК ВГЧ-6 (ВГЧ-6М); 2 — в крови пациентов не выявлялась ДНК ВГЧ-6 (ИМ иной этиологии); 3 — в крови пациентов выявлялась ДНК ВГЧ-6 и любого из двух других герпесвирусов (микст-инфекция). В качестве группы сравнения выступили практически здоровые дети сопоставимого пола и возраста, не имевшие на момент исследования клинических и лабораторных признаков ИМ.

Предметом исследования явилось абсолютное содержание популяций лимфоидных клеток периферической крови: общей популяции Т-лимфоцитов (CD3⁺, ТЛ), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD8⁻, Тх), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻CD8⁺, ЦТЛ), дубль-позитивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺, дпТЛ), NK-клеток (CD3⁻

CD16⁺CD56⁺), В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺, ВЛ). Популяционный состав клеток крови исследовали методом многоцветной проточной цитофлуориметрии. Использовали 6-цветную панель реагентов «BD Multitest™» с пробирками Trucount («BD Biosciences», США).

На основе проанализированного материала была сформирована матрица, где каждая строка соответствовала пациенту, отнесенному к той или иной группе, а столбцы представляли собой факторы — значения содержания популяций клеток крови. Далее проводился попарный анализ всех исследованных групп детей.

Бинарная классификация. Строилась модель зависимости принадлежности пациента к одной из двух групп от значений факторов в различных комбинациях. При этом определяли, возможна ли классификация (разделение на группы) пациентов на основе факторов и какая комбинация факторов наиболее пригодна для классификации. Использовался один из методов машинного обучения — алгоритм градиентного бустинга над решающими деревьями (gradient boosting classifier, GBC). Алгоритм был реализован в пакете «scikit-learn» для языка Python [4].

Каждый набор данных разделяли на тренировочную и тестовую выборки в соотношении 0,7:0,3. Обучение классификатора проводили на тренировочной выборке, валидацию работы классификатора — на тестовой выборке. Для получения статистически устойчивых результатов использовали метод кросс-валидации (функция StratifiedShuffleSplit из пакета «scikit-learn»), повторяя процедуру разделения 30 раз.

В качестве метрик эффективности работы классификатора применяли параметры:

- площадь под кривой ошибок (area under receiver operating characteristic curve, area under ROC, AUC) — соотношение доли истинно-положительных результатов и доли ложноположительных результатов (то есть степень отличия классификатора от случайного);
- аккуратность (score) — доля правильно классифицированных образцов тестовой выборки.

Благодаря применению метода кросс-валидации получали множество значений метрик эффективности, для которых рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Качество классификатора считали удовлетворительным при среднем значении $AUC \geq 0,75$.

Для каждой пары групп сравнения строилась набор GBC-моделей с учетом всех возможных комбинаций факторов. Определяли набор факторов, дающий классификатор с максимально возможными значениями AUC и score. Для каждого из факторов рассчитывали важность (feature importance) — значимость фактора для процедуры классификации. Сумма важностей всех факторов составляла 1.

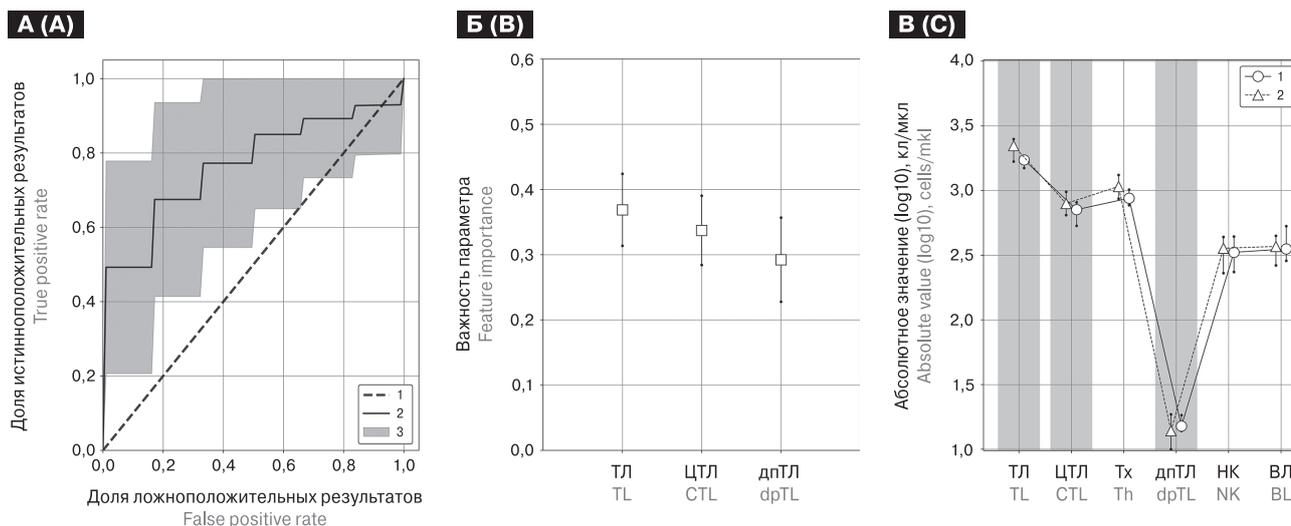


Рисунок 1. Дискриминантный анализ (с использованием GBC) количественного состава популяций иммунокомпетентных клеток здоровых детей и детей с ВГЧ-6М

Figure 1. Discriminant analysis (using GBC), applied to quantitative composition of populations of immunocompetent cells in virtually healthy children and children with HHV-6M

А — график кривой ошибок GBC модели: 1 — ROC-кривая случайного классификатора (AUC = 0.5); 2 — усредненная ROC-кривая GBC модели; 3 — стандартное отклонение значений ROC-кривой GBC модели. Б — важность параметров в GBC модели (среднее значение и стандартное отклонение). В — абсолютные значения параметров, использованных в GBC модели (медиана, 25 и 75 квантили): 1 — практически здоровые дети; 2 — дети с ВГЧ-6М.

A — ROC-curve of GBC model: 1 — ROC-curve of random classifier (AUC = 0.5); 2 — mean ROC-curve of GBC model; 3 — GBC model ROC-curve standard deviation. B — feature importance of GBC model (mean and standard deviation). C — absolute values of features, used in GBC model (median, 25 and 75 quantile): 1 — virtually healthy children; 2 — children with HHV-6M.

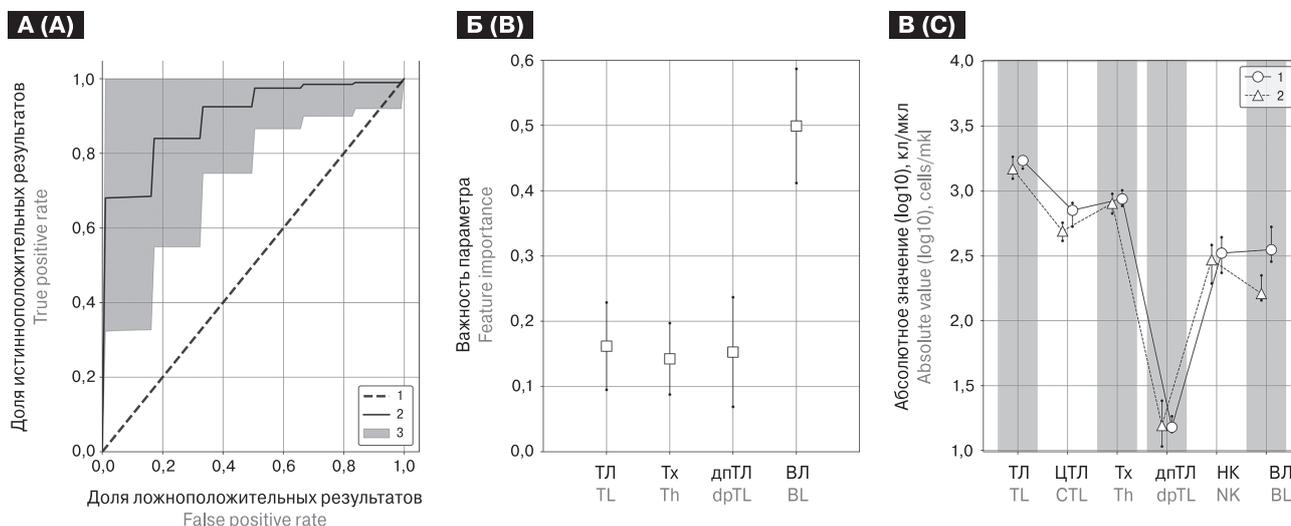


Рисунок 2. Дискриминантный анализ (с использованием GBC) количественного состава популяций иммунокомпетентных клеток здоровых детей и детей с ИМ иной этиологии

Figure 2. Discriminant analysis (using GBC), applied to quantitative composition of populations of immunocompetent cells in virtually healthy children and children with IM of other etiology

А — график кривой ошибок GBC модели: 1 — ROC-кривая случайного классификатора (AUC = 0.5); 2 — усредненная ROC-кривая GBC модели; 3 — стандартное отклонение значений ROC-кривой GBC модели. Б — важность параметров в GBC модели (среднее значение и стандартное отклонение). В — абсолютные значения параметров, использованных в GBC модели (медиана, 25 и 75 квантили): 1 — практически здоровые дети; 2 — дети с ИМ иной этиологии.

A — ROC-curve of GBC model: 1 — ROC-curve of random classifier (AUC = 0.5); 2 — mean ROC-curve of GBC model; 3 — GBC model ROC-curve standard deviation. B — feature importance of GBC model (mean and standard deviation). C — absolute values of features, used in GBC model (median, 25 and 75 quantile): 1 — virtually healthy children; 2 — children with IM of other etiology.

Результаты

При разделении практически здоровых детей и детей с ВГЧ-6М наилучший результат ($AUC = 0,77 \pm 0,17$, $score = 0,72 \pm 0,12$) был достигнут с использованием факторов содержания ТЛ, ЦТЛ и дпТЛ (рис. 1), из которых ТЛ характеризовался большей важностью. По сравнению с практически здоровыми детьми количество ТЛ в крови детей с ВГЧ-6М было повышено в 1,3 раза, а количество ЦТЛ — в 1,1 раза. Содержание дпТЛ было снижено в 1,1 раза.

При классификации практически здоровых детей и детей с ИМ иной этиологии максимальные метрики эффективности ($AUC = 0,90 \pm 0,13$, $score = 0,83 \pm 0,11$) демонстрировала модель, учитывающая сочетанное содержание ТЛ, Тх, дпТЛ и ВЛ (рис. 2). Наибольшей важностью для классификатора обладал фактор содержания ВЛ, в то время как важность остальных факторов была равноценно низкой. Содержание ТЛ в крови детей с ИМ иной этиологии снижалось в 1,2 раза, содержание Тх — в 1,1 раза, содержание ВЛ — в 2,2 раза. Количество дпТЛ возрастало в 1,1 раза по сравнению с практически здоровыми детьми.

Классификация детей с ВГЧ-6М и ИМ иной этиологии была проведена с максимальной эффективностью ($AUC = 0,87 \pm 0,13$, $score =$

$0,76 \pm 0,12$) при включении в модель факторов содержания Тх, ЦТЛ, дпТЛ и ВЛ (рис. 3). Наибольшую важность для классификатора имел фактор содержания ВЛ. При сравнении детей с ВГЧ-6М и ИМ иной этиологии выявлено, что у детей с ВГЧ-6М содержание Тх в крови было выше в 1,3 раза, содержание ЦТЛ — в 1,6 раза, содержание ВЛ — в 2,3 раза. Количество дпТЛ было ниже в 1,1 раза.

При попытке классифицировать пары сравнения здоровые дети — дети с микст-инфекцией, дети с ВГЧ-6М — дети с микст-инфекцией и дети с ИМ иной этиологии — дети с микст-инфекцией модель с удовлетворительным качеством классификатора построить не удалось.

Обсуждение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что у детей ВГЧ-6М оказывает влияние на содержание популяций иммунокомпетентных клеток периферической крови, отличное от ИМ иной этиологии. По сравнению с практически здоровыми детьми, ВГЧ-6М у детей характеризовался повышением содержания ТЛ, ЦТЛ и снижением количества дпТЛ. При сравнении с ИМ иной этиологии, ВГЧ-6М отличался повышенным содержанием ЦТЛ, Тх и ВЛ, а также снижением количества дпТЛ.

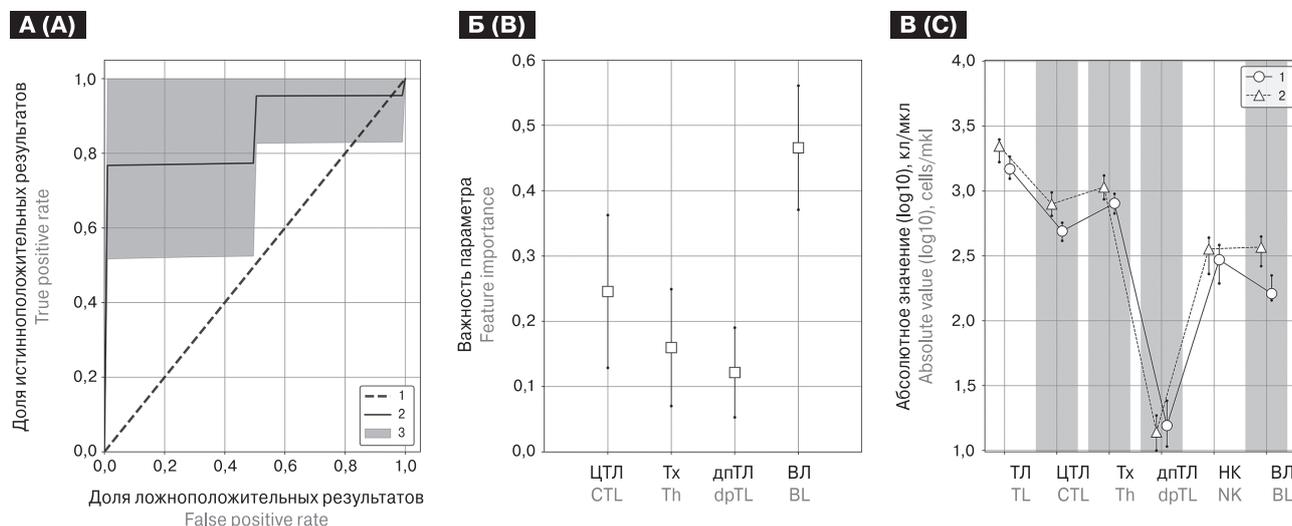


Рисунок 3. Дискриминантный анализ (с использованием GBC) количественного состава популяций иммунокомпетентных клеток детей с ИМ иной этиологии и детей с ВГЧ-6М

Figure 3. Discriminant analysis (using GBC), applied to quantitative composition of populations of immunocompetent cells in children with IM of other etiology and children with HHV-6M

А — график кривой ошибок GBC модели: 1 — ROC-кривая случайного классификатора ($AUC = 0.5$); 2 — усредненная ROC-кривая GBC модели; 3 — стандартное отклонение значений ROC-кривой GBC модели. Б — важность параметров в GBC модели (среднее значение и стандартное отклонение). В — абсолютные значения параметров, использованных в GBC модели (медиана, 25 и 75 квантили): 1 — дети с ИМ иной этиологии; 2 — дети с ВГЧ-6М.

А — ROC-curve of GBC model: 1 — ROC-curve of random classifier ($AUC = 0.5$); 2 — mean ROC-curve of GBC model; 3 — GBC model ROC-curve standard deviation. B — feature importance of GBC model (mean and standard deviation). C — absolute values of features, used in GBC model (median, 25 and 75 quantile): 1 — children with IM of other etiology; 2 — children with HHV-6M.

Существует два вида ВГЧ-6: ВГЧ-6А и ВГЧ-6В. ВГЧ-6А чаще всего выявляется у ВИЧ-инфицированных лиц [4] и пациентов с нейровоспалительными заболеваниями [12]. ВГЧ-6В более распространен в популяции и в 97% случаях является этиологической причиной ВГЧ-6-ассоциированных заболеваний детей и взрослых [7]. Два вида вируса имеют различную тропность к иммунокомпетентным клеткам. ВГЧ-6А эффективно поражает Тх, ЦТЛ и НК-клетки. ВГЧ-6В обладает тропизмом к Тх и дендритным клеткам, но не способен персистировать в ЦТЛ [2, 6]. Оба вируса способны поражать ВЛ, однако только при условии коинфицирования ВЭБ [3]. При развитии инфекции ВГЧ-6 угнетает противовирусный иммунный ответ за счет подавления пролиферации пораженных клеток и изменения баланса продуцируемых ими цитокинов и хемокинов широкого спектра [6, 8].

дпТЛ периферической крови являются популяцией клеток с недостаточно охарактеризованными функциональными свойствами. Известно, что при вирусных инфекциях дпТЛ способны усиливать миграцию и цитотоксическую функцию ЦТЛ [10]. ВГЧ-6А способен индуцировать экспрессию молекулы CD4 на поверхности пораженных CD8⁺ Т-клеток, тем самым вызывая повышение содержания дпТЛ [9]. Данные о взаимодействии ВГЧ-6В с дпТЛ на сегодняшний день отсутствуют.

В нашем исследовании мы не определяли вид ВГЧ-6, являющийся этиологическим агентом ИМ. Однако на основании эпидемиологических данных мы можем предположить, что наиболее вероятно дети с ВГЧ-6М были инфицированы вирусом вида В. Выявленные нами отличительные особенности содержания популяций имму-

нокомпетентных клеток при ВГЧ-6М отражают как биологические свойства вируса, так и работу иммунной системы пациентов. Так, отличительной чертой инфекции явилось повышение содержания ЦТЛ, что может свидетельствовать об усилении цитотоксического звена иммунитета. При этом содержание дпТЛ падало либо вследствие поражения вирусом, либо в результате апоптоза, вызванного гиперактивацией клеток [10]. В отличие от ИМ иной этиологии, при ВГЧ-6М не наблюдали снижения количества ВЛ, очевидно, вследствие неспособности вируса поражать клетки этой популяции.

Следует также отметить, что в случае микстинфекции не удалось выявить отличительных особенностей содержания иммунокомпетентных клеток. Предположительно, полученный результат обусловлен разнонаправленным влиянием нескольких вирусов, персистирующих в одном организме.

Заключение

Нами был определен комплекс показателей состояния клеточного звена иммунитета, характерный для развития ВГЧ-6М у детей. По сравнению с практически здоровыми детьми, отличительными иммунологическими особенностями течения инфекционного процесса явилось повышение содержания ТЛ и ЦТЛ и снижение количества дпТЛ в периферической крови. В отличие от ИМ иной этиологии, ВГЧ-6М не сопровождался снижением содержания Тх и ВЛ. Полученные результаты отражают особенности иммунопатогенеза ВГЧ-6М и могут использоваться в качестве дополнительного критерия при постановке диагноза ИМ у детей.

Список литературы/References

1. Новосад Е.В., Шамшева О.В., Львов Н.Д., Мельниченко А.В., Егорова Н.Ю., Михайловская Г.В., Никитина А.А., Зоненштайн Т.П. Инфекционный мононуклеоз, ассоциированный с вирусом герпеса 6 типа // Детские инфекции. 2008. Т. 7, № 1. С. 36–38. [Novosad E.V., Shamsheva O.V., Lvov N.D., Melnichenko A.V., Yegorova N.Yu., Mikhaylovskaja G.V., Nikitina A.A., Zonenshain T.P. Infectious mononucleosis, associated with herpes virus type 6. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2008, vol. 7, no. 1, pp. 36–38. (In Russ.)]
2. Филатова Е.Н., Уткин О.В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции // МедиАль. 2014. № 2 (12). С. 172–197. [Filatova E.N., Utkin O.V. Modern approaches to the modeling of herpesvirus infection. *MediAl' = MediAl*, 2014, no. 2 (12), pp. 172–197. (In Russ.)]
3. Ablashi D.V., Lusso P., Hung C.L., Salahuddin S.Z., Josephs S.F., Llana T., Kramarsky B., Biberfeld P., Markham P.D., Gallo R.C. Utilization of human hematopoietic cell lines for the propagation and characterization of HBLV (human herpesvirus 6). *Int. J. Cancer*, 1989, vol. 42, iss. 5, pp. 787–791. doi: 10.1002/ijc.2910420526
4. Ablashi D.V., Marsh S., Kaplan M., Whitman J.E., Pearson G.R. HHV-6 infection in HIV-infected asymptomatic and AIDS patients. *Intervirology*, 1998, vol. 41, no. 1, pp. 1–9. doi: 10.1159/000024909
5. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K. Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis. *Cambridge: Cambridge University Press*, 2007, 1408 p.
6. Dagna L., Pritchett J.C., Lusso P. Immunomodulation and immunosuppression by human herpesvirus 6A and 6B. *Future Virol.*, 2013, vol. 8, no. 3, pp. 273–287. doi: 10.2217/fvl.13.7
7. Dewhurst S., McIntyre K., Schnabel K., Hall C.B. Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 2, pp. 416–418.
8. Flamand L., Gosselin J., Stefanescu I., Ablashi D., Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood*, 1995, vol. 85, iss. 5, pp. 1263–1271.

9. Lusso P., De Maria A., Malnati M., Lori F., DeRocco S.E., Baseler M., Gallo R.C. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8⁺ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature*, 1991, vol. 349, no. 6309, pp. 533–535. doi: 10.1038/349533a0
10. Overgaard N.H., Jung J.-W., Steptoe R.J., Wells J.W. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.*, 2015, vol. 97, iss. 1, pp. 31–38. doi: 10.1189/jlb.1RU0814-382
11. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Prettenhofer P., Weiss R., Dubourg V., Vanderplas J., Passos A., Cournapeau D., Brucher M., Perrot M., Duchesnay E. Scikit-learn: machine learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.*, 2011, vol. 12, pp. 2825–2830.
12. Soldan S.S., Berti R., Salem N., Secchiero P., Flamand L., Calabresi P.A., Brennan M.B., Maloni H.W., McFarland H.F., Lin H.C., Patnaik M., Jacobson S. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, no. 12, pp. 1394–1397.

Авторы:

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Солнцев Л.А., к.б.н., зав. лабораторией ГИС-технологий и биоинформатики ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Кулова Е.А., к.м.н., ассистент кафедры детских инфекций ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский институт МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия; доцент кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский институт МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Filatova E.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Solntsev L.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of GIS-Technology and Bioinformatics, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Presnyakova N.B., Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kulova E.A., PhD (Medicine), Assistant of the Department of Children Infections, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation; Associate Professor, Department of Microbiology and Immunology, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 17.01.2018
Принята к печати 08.02.2018

Received 17.01.2018
Accepted 08.02.2018

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ IgM-КОРЬ АНТИТЕЛ В РАЗНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОНАХ

М.А. Бичурина, Н.В. Железнова, И.Н. Лаврентьева, А.Ю. Антипова,
Л.Б. Куляшова, Арег А. Тотолян

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

Резюме. Признанным ВОЗ стандартом лабораторного подтверждения диагноза «корь» является выявление в сыворотке крови больных методом ИФА IgM-корь антител. Ранее было показано, что IgM-корь определены в 97,2–100% сывороток больных с помощью тестов формата «capture» (Microimmun Ltd. и Вектор-Бест), но при использовании тест-систем формата «indirect» (Siemens, Германия) доля положительных сывороток не превышала 63,9%. И напротив, при использовании одной из тест-систем для выявления IgM-корь формата «indirect» (Euroimmun, Германия) были получены ложноположительные результаты. Цель работы: сравнительная оценка тест-систем разного формата при исследовании сывороток крови на IgM-антитела от лиц из разных географических зон. **Материалы и методы.** Клинические образцы (n = 108), получены в 2015–2017 гг. от здоровых взрослых жителей Гвинейской Республики (ГР); от больных 1–70 лет с первичными диагнозами «инфекционный мононуклеоз», «цитомегаловирусная инфекция» и «краснуха» из банка сывороток лаборатории СПбРЦ по надзору за корью и краснухой в СЗФО. Использовали тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия («capture» формат) и производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG, Германия («indirect» формат). Наличие антител к вирусу Эпштейна–Барр определяли в ИФА с тест-системами производства НПО «Диагностические системы», Россия («ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-VCA-M», «ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-EA-G», «ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-NA-G»). **Результаты и обсуждение.** При исследовании сывороток крови от здоровых и больных лиц, проживающих на территории СЗФО и в Гвинейской Республике, в ИФА с тест-системой «ВектоКорь IgM» антитела IgM-корь не были выявлены. Отсутствие острой инфекции также подтверждено наличием высокого уровня IgG-антител и высоким процентом авидности IgG-корь антител. При исследовании этих же сывороток в ИФА с тест-системой Euroimmun, Германия, выявлено 6 положительных сывороток (5,5%), в которых обнаружены также антитела к вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ). Полученные результаты можно рассматривать как неспецифическую реакцию, обусловленную возможной перекрестной реакцией с антителами против ВЭБ, что предусмотрено фирмой-производителем. Выявлено преобладание ложноположительных реакций у лиц, постоянно проживающих в ГР (8,5±4,0%), по отношению к гражданам РФ (3,2±2,2%). Полученные данные оцениваются как предварительные. Для получения окончательных результатов следует увеличить объем выборки исследуемых сывороток.

Ключевые слова: корь, специфические антитела, тест-системы, метод ИФА, «capture» формат, «indirect» формат, перекрестная реактивность.

Адрес для переписки:

Антипова Анастасия Юрьевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, ФБУН НИИ
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.).
Факс: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: anti130403@mail.ru

Contacts:

Anastasiya Yu. Antipova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office).
Fax: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: anti130403@mail.ru

Библиографическое описание:

Бичурина М.А., Железнова Н.В., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю.,
Куляшова Л.Б., Тотолян Арег А. Предварительные результаты
сравнительного изучения ИФА тест-систем разного формата
при определении IgM-корь антител в разных географических зонах //
Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 230–234. doi: 10.15789/2220-
7619-2018-2-230-234

Citation:

Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu.,
Kulyashova L.B., Totolian Areg A. Comparative study of ELISA test-systems
of different formats for detection of measles virus specific IgM in different
geographic zones. Preliminary results // Russian Journal of Infection
and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 230–234.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-2-230-234

STUDY OF ELISA TEST-SYSTEMS OF DIFFERENT FORMATS FOR DETECTION OF MEASLES VIRUS SPECIFIC IgM IN DIFFERENT GEOGRAPHIC ZONES

Bichurina M.A., Zheleznova N.V., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Kulyashova L.B., Totolian Areg A.

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

Abstract. Detection of the measles virus (MV) specific IgM antibodies in blood serum of patients is considered to be the main standard for the laboratory confirmation of measles diagnosis, the test being acknowledged by WHO. As it was demonstrated earlier the specific IgM antibodies as the marker of the acute MV infection were detected in 97.2–100% of blood serum samples from patients using the ELISA test-systems of the “capture” format (Microimmun Ltd. and Vector Best). In case when the ELISA test-system of the “indirect” format (Siemens, Germany) was used only 63.9% of these sera turned to be IgM positive. And on the contrary using the “indirect” format ELISA test-system Euroimmun, Germany, for detection of the MV specific IgM the false positive results were obtained. The aim of the study was the comparative evaluation of the different format ELISA test-systems used for the detection of the MV specific IgM antibodies in blood sera of patients and healthy adults collected in different geographic zones. *Materials and methods.* In total 108 serum specimens collected in 2015–2017 were studied: from healthy adult Guineans, residents of the Republic of Guinea (RG); patients aged 1–70 with the initial “infectious mononucleosis”, “infectious cytomegalovirus” and “rubella” diagnosis and taken from the bank of sera in the Subnational Measles/Rubella laboratory, StP Measles/Rubella RC in NWFR. The MV specific IgM antibodies were detected using the commercial ELISA test-systems “VectoMeasles-IgM” (Vector-Best, Russia) (“capture” format) and “Anti-Measles Virus ELISA IgM (NP)” (Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG, Germany) («indirect» format). The specific Epstein-Barr Virus (EBV) IgM and IgG antibodies were detected with the commercial ELISA test-systems «DS-ELISA-anti-EBV-VCA-M», «DS-ELISA-anti-EBV-EA-G» and «DS-ELISA-anti-EBV-NA-G» (“Diagnostic Systems”, Russia). *Results and discussion.* The MV specific IgM antibodies were not revealed in the total of 108 blood serum samples from the healthy adults and patients, residents of the Russia and of the RG, with the “capture” format “VectoMeasles-IgM” ELISA test-system. The absence of the acute MV infection was also confirmed by the high measles immunity level (i.e. IgG MV antibodies titers) as well as by detection of the IgG antibodies of high avidity. At the same time in 6 of 108 total sera (5.5%) IgM MV antibodies were detected with the «indirect» format ELISA test system Euroimmun, Germany. In these 6 sera the EBV specific antibodies were also evidenced. The results obtained demonstrate the nonspecific reaction due to the possible reactivity with anti-EBV antibodies. Besides this the different percentage of the false positive reactions in sera from healthy adults, residents of the RG and residents of Russia was determined — $8.5 \pm 4.0\%$ and $3.2 \pm 2.2\%$ correspondently. Thus the preliminary results, and to get the final results for general conclusions increase of the total amount of the clinical specimens under studying is of extremely importance.

Key words: measles, specific antibodies, test-systems, ELISA method, “capture” format, “indirect” format, cross reactivity.

Введение

Корь до настоящего времени остается одной из причин детской смертности не только в развивающихся странах, но в отдельные годы приводит к возникновению крупных вспышек и в индустриальных странах [2, 3, 6, 7]. Так, были зарегистрированы большие вспышки кори даже в странах Европейского региона ВОЗ — Болгарии, Румынии, Италии и других [5, 7]. Однако, несмотря на то, что имеются высоко иммуногенные вакцины против кори, не во всех странах достигнут высокий ($\geq 95\%$) уровень охвата вакцинацией детей, особенно раннего возраста. Стратегический план, принятый ВОЗ, предусматривает элиминацию кори, краснухи и врожденной краснухи к 2020 г.

Имеется ряд проблем и в лабораторной диагностике кори. Признанным ВОЗ основным стандартом лабораторного подтверждения диагноза «корь» является выявление в сыворотке крови больных методом ИФА IgM-корь антител [4]. Для этой цели используются

коммерческие тест-системы разных форматов: непрямой, «indirect», и метод двойного сэндвича — «capture». В работах Т.А. Мамаевой с соавт. показаны ограничения при использовании тест-систем для выявления IgM-АТ формата «indirect» в диагностике коревой инфекции у больных, имевших в анамнезе противокоревую вакцинацию [1]. Маркеры острой инфекции (IgM) определены в 100 и 97,2% сывороток больных с помощью тестов формата «capture» — Вектор-Бест и Microimmun Ltd. соответственно. При исследовании сывороток в тест-системах формата «indirect» положительных сывороток было выявлено меньше: фирмы Siemens (Германия) — 68,1%, Euroimmun (Германия) — 63,9%.

В других работах [2] напротив показано, что у практически здоровых лиц в одной из тест-систем формата «indirect» (Euroimmun, Германия) были выявлены IgM-положительные сыворотки, которые оказались отрицательными при исследовании этих сывороток в тест-системах формата «capture». При этом в ин-

струкции к тест-системе Euroimmun (Германия) указано на возможность ложноположительных результатов при определении IgM-корь антител при наличии IgM-антител против вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Цель работы — сравнительная оценка тест-систем разного формата при исследовании сывороток крови на IgM-антитела от лиц из разных географических зон.

Материалы и методы

Исследованы сыворотки крови:

— от 47 практически здоровых лиц в возрасте от 24 лет до 71 года, постоянно проживающих в Гвинейской Республике, кровь взята в 2015–2016 гг.;

— от 23 больных в возрасте от 1 года до 70 лет с первичными диагнозами «инфекционный мононуклеоз» и «краснуха», сыворотки крови поступили с 11 территорий Северо-Западного федерального округа (СЗФО) РФ в Санкт-Петербургский Региональный Центр (СПбРЦ) по надзору за корью и краснухой в 2016–2017 гг. в рамках Программы элиминации кори, краснухи и врожденной краснухи в РФ;

— от 38 больных в возрасте до 14 лет с первичными диагнозами «инфекционный мононуклеоз» и «цитомегаловирусная инфекция» из одной из клиник Санкт-Петербурга в 2017 г.

Всего исследованы в ИФА на IgM-корь антитела сыворотки крови от 108 лиц.

Для определения противокоревых IgM-антител методом ИФА использовали тест-системы производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия («capture» формат) и производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Германия («indirect» формат). Для определения IgG-корь антител в ИФА была использована тест-система «ВектоКорь IgG», Россия; для определения уровня авидности IgG-корь антител использована тест-система «Avidity: Anti-Measles Virus ELISA (IgG)» производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Германия.

Для определения противокраснушных (IgM) антител использовали тест-системы производства ЗАО «ЭКОлаб», Россия («capture» формат) и тест-системы производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Германия («indirect» формат).

Наличие антител к вирусу Эпштейна–Барр определяли в ИФА с тест-системами производства НПО «Диагностические системы», Россия («ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-VCA-M», «ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-EA-G», «ДС-ИФА-Анти-ВЭБ-NA-G»).

Результаты и обсуждение

При параллельном исследовании 47 сывороток крови практически здоровых взрослых, проживающих в Гвинейской Республике, с отечественной тест-системой IgM-корь производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) и импортной Euroimmun (Германия) были получены разные результаты (табл.). При использовании отечественной тест-системы все сыворотки оказались отрицательными в отношении IgM-корь антител. При исследовании этих же сывороток с использованием импортной тест-системы IgM-корь антитела были выявлены в четырех образцах. По данным анамнеза было установлено, что эти лица в последние 6 месяцев не болели какими-либо заболеваниями, сопровождающимися сыпью. Были проведены дополнительные исследования этих сывороток в ИФА с тест-системами Euroimmun (Германия) на наличие IgG-корь антител и авидность IgG-корь антител. В данных сыворотках выявлены высокие титры IgG антител (более 2000 IU/L) с высоким уровнем авидности (более 83,5%), что не подтверждало наличия у этих лиц острой инфекции.

В трех из четырех образцов выявлены также IgM-антитела к цитомегаловирусу и вирусу Эпштейна–Барр. Вероятно, выявление IgM-антител к вирусу кори в этих образцах при исследовании в тест-системе «Anti-Measles Virus ELISA (IgM)» следует расценивать как ложноположительные результаты, обусловленные неспецифическими факторами, поскольку в инструкции к этой тест-системе указана допустимая частота (до 29%) ложноположительных результатов при наличии в сыворотках крови IgM-антител к вирусу Эпштейна–Барр. Следует отметить, что при исследовании 47 сывороток крови от практически здоровых взрослых из Гвинейской Республики IgM-антитела к ВЭБ были обнаружены у 15 человек (32%), что свидетельствует о широком инфицировании ВЭБ жителей Гвинейской Республики.

Исследования были продолжены с сыворотками крови больных с предварительными диагнозами «инфекционный мононуклеоз», «краснуха» и «цитомегаловирусная инфекция», полученных с территорий СЗФО, в том числе из Санкт-Петербурга. Отсутствие противокоревых и противокраснушных антител класса IgM было лабораторно подтверждено методом ИФА с использованием отечественных тест-систем «ВектоКорь IgM» (Вектор-Бест) и «ИФА-Краснуха IgM» (ЭКОлаб). Из 23 сывороток крови, полученных с территорий СЗФО с диагнозами «инфекционный мононуклеоз» и «краснуха» в 8 сыворотках были выявлены IgM-антитела к ВЭБ, которые в сочетании с EA IgG-антителами подтверждали острую пер-

Таблица. Результаты исследования сывороток крови на наличие IgM-корь антител в ИФА с тест-системами разного формата

Table. The results of the study of blood serum for the presence of IgM-measles antibodies in ELISA with test-systems of different formats

Число исследованных сывороток Number of blood serum	Место проживания обследованных лиц Place residence of the surveyed persons	Наличие IgM-антител к вирусу кори The presence of IgM-measles antibodies	
		Вектор-Бест, Россия, абс./% Vector-Best, Russia, abs./%	Euroimmun, Германия, абс./% Euroimmun, Germany, abs./%
47	Гвинейская Республика Republic of Guinea	0	4/8,5
23	СЗФО North-West federal district	0	1/4,3
38	Санкт-Петербург St. Petersburg	0	1/2,6
108		0	6/5,5

вичную инфекцию ВЭБ, а в сочетании с EA IgG- и NA IgG-антителами свидетельствовали о реактивации инфекции. В пяти случаях это были больные с первичным диагнозом «инфекционный мононуклеоз» и в трех случаях — с диагнозом «краснуха». Из 23 отрицательных в отношении кори сывороток, подтвержденных в ИФА с тест-системой «ВектоКорь IgM», одна сыворотка оказалась IgM-корь положительной при использовании тест-системы Euroimmun (Германия) (показатель оптической плотности составил 1,287 о.е., значение R было равно 3,72), в этом образце также были обнаружены IgM-антитела к ВЭБ.

В исследование также были включены 18 сывороток крови от детей, госпитализированных в один из стационаров Санкт-Петербурга с лабораторно подтвержденной инфекцией, вызванной ВЭБ, и 20 сывороток детей с лабораторно подтвержденной цитомегаловирусной инфекцией. Все сыворотки, исследованные на наличие IgM-корь антител в ИФА с тест-системой «ВектоКорь IgM», оказались отрицательными. У одного пациента с лабораторно подтвержденной инфекцией, вызванной ВЭБ, в ИФА с тест-системой «Anti-Measles Virus ELISA (IgM)» фирмы «Euroimmun» (Германия) были выявлены IgM-корь антитела (показатель оптической плотности составил 0,462 о.е., значение R было равно 1,32).

Дополнительно был проведен сравнительный анализ результатов определения противокраснушных антител класса IgM с помощью тест-систем двух форматов в сыворотках 18 пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом «цитомегаловирусная инфекция». Различий в результатах использования двух тест-систем не было получено. Ни в одном случае не были выявлены IgM-антитела к вирусу краснухи.

В целом при исследовании 108 сывороток крови от здоровых и больных лиц, проживающих на территории СЗФО РФ и в Гвинейской Республике, в ИФА с тест-системой «ВектоКорь IgM» антитела IgM-корь не были выявлены. Отсутствие острой инфекции также подтверждено наличием высокого уровня IgG-антител и высоким процентом авидности IgG-корь антител. При исследовании этих же сывороток в ИФА с тест-системой «Euroimmun» (Германия) выявлено 6 положительных сывороток (5,5%), в которых обнаружены также антитела к ВЭБ. В инструкции фирмы «Euroimmun» (Германия) представлены данные о возможной перекрестной реакции с антителами против ВЭБ. Вследствие этого, могут быть получены ложноположительные результаты при определении IgM-корь антител. Полученные нами положительные результаты можно рассматривать как неспецифическую реакцию.

Кроме того, выявлен разный процент ложноположительных реакций среди практически здоровых взрослых, постоянно проживающих в Гвинейской Республике ($8,5 \pm 4,0\%$), и у больных, постоянно проживающих в РФ ($3,2 \pm 2,2\%$).

При исследовании сывороток крови на наличие антител IgM-краснуха в тест-системах ИФА двух форматов положительных сывороток не было выявлено.

Таким образом, при определении противокоревых IgM-антител показано наличие перекрестной реактивности в отношении ВЭБ в тест-системе фирмы «Euroimmun» (Германия) и выявлена более высокая специфичность тест-системы фирмы «Вектор-Бест», Россия.

Вместе с тем, это предварительные данные, и для получения окончательных результатов следует увеличить объем выборки исследуемых сывороток, что и будет продолжено в рамках проекта с Гвинейской Республикой.

Список литературы/References

1. Мамаева Т.А., Наумова М.А., Железнова Н.В., Липская Г.Ю., Mulders S.M., Featherstone D.A. Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 5. С. 43–48. [Mamaeva T.A., Naumova M.A., Zheleznova N.V., Lipskaya G.Y., Mulders M., Featherstone D.A. Estimation of the commercial elisa test-systems of different formats to detect specific IgM and IgG in the measles patients sera. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, vol. 58, no. 5, pp. 43–48. (In Russ.)]
2. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербаклова С.А., Буаро М.Й., Тотолан А.А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 2 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 79–84. [Popova A.Y., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Y., Shcherbakova S.A., Boiro M.Y., Totolian A.A. Measles virus immunity level study in particular population groups of the republic of guinea within the framework of global measles elimination program. Report 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 79–84. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-79-84 (In Russ.)]
3. Getahun M., Beyene B., Ademe A., Teshome B., Tefera M., Asha A., Afework A., Hailemariam Y., Assefa E., Gallagher K. Epidemiology of laboratory confirmed measles virus cases in Amhara Regional State of Ethiopia, 2004–2014. *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16 (133), 7 p. doi: 10.1186/s12879-016-1457-7
4. Parent du Chatelet I., Floret D., Antona D., Levy-Bruhl D. Measles resurgence in France in 2008, a preliminary report. *Euro Surveill.*, 2009, vol. 14, iss. 6: 19118. doi: 10.2807/ese.14.06.19118-en
5. Suk J.E., Jimenez A.P., Kourouma M., Derrough T., Balde M., Honomou P., Kolie N., Mamadi O., Tamba K., Lamah K., Loua A., Mollet T., Lamah M., Camara A., Prikazsky V. Post-Ebola measles outbreak in Lola, Guinea, January-June 2015. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 6, pp. 1106–1108. doi: 10.3201/eid2206.151652
6. World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2006, Geneva, Switzerland. URL: http://www.who.int/ihr/ehlibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_en.pdf (18.05.2018)
7. World Health Organization. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system. 2016 global summary. URL: http://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary/countries?countrycriteria%5Bcountry%5D%5B%5D=GIN&commit=OK (18.05.2018)

Авторы:

Бичурина М.А., д.м.н., зав. лабораторией этиологии и контроля вирусных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Железнова Н.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов 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;
Антипова А.Ю., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Куляшова Л.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории идентификации патогенов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Тотолан Арег А., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Bichurina M.A., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Etiology and Control of Viral Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Zheleznova N.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Lavrentieva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of experimental virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Antipova A.Yu., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of experimental virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kulyashova L.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Identification of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Totolian Areg A., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИНФЕКЦИОННЫЕ МАРКЕРЫ БЕСПЛОДИЯ

Е.А. Левкова¹, С.З. Савин², Э.Б. Емельянова³, И.В. Смиренина⁴

¹ ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный университет путей сообщения, г. Хабаровск, Россия

² ФБГУН Вычислительный центр ДВО РАН, г. Хабаровск, Россия

³ ГБУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁴ КГБОУ ДПО Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения МЗ Хабаровского края, г. Хабаровск, Россия

Резюме. Представлены результаты собственных исследований наиболее значимых факторов в генезе различных форм стерильности. Пятьдесят супружеских пар обследовались с учетом возможной этиологической структуры данных форм патологии — герпетических инфекций, обусловленных вирусами простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), и генетического распределения по антигенам главного комплекса гистосовместимости второго класса (HLA II класса): HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1. Приведены собственные данные по генетическому типированию супружеских пар по HLA II класса, которые позволяют соотнести эти данные с клинико-лабораторными признаками герпесвирусных инфекций. Генетические особенности, определяющие репродуктивные возможности семейной пары, ассоциируются и с чувствительностью к определенным инфекционным агентам. Показано, что у доминирующего большинства семейных пар определялся ген HLA-DRB1, который с большей частотой ассоциировался с герпесвирусными инфекциями. Несмотря на то, что уровень ПЦР-положительных результатов в группе семейных пар с первичным бесплодием был выше, чем в семейных парах со вторичной стерильностью (100 и 92% соответственно), максимальные значения титров специфических антител к герпесвирусам, в том числе и частота обнаружения маркеров обострения инфекции (IgM-антител) в группе семейных пар со вторичной стерильностью были выше, чем в группе семейных пар с первичным бесплодием, и значительно выше, чем в семейных парах с нормальной фертильностью. Следовательно, именно данный антиген гистосовместимости — HLA-DRB1 — ассоциируется со значительной частотой стерильности и инфекционной контаминацией герпесвирусами (ВПГ 1, 2 типов, ЦМВ, ВЭБ) у семейных пар со вторичным бесплодием. Маркер HLA-DRB1, наиболее часто встречающийся в семейных парах с бесплодием, в том числе и с идиопатическим, ассоциируется у данного контингента не только со значительной контаминацией герпесвирусами, но и наличием хронического инфекционного процесса в стадии реактивации. Проведенные клинико-иммунологические исследования наглядно демонстрируют необходимость комплексного обследования женщин с функциональными нарушениями в системе иммуногенеза с обязательной оценкой уровня инфекционной (вирусной) контаминации. Анализ результатов собственных клинико-иммунологических исследований позволяет предложить алгоритм комплексного обследования при функциональных нарушениях в системе иммуногенеза, включив в него изучение уровня вирусной нагрузки в качестве необходимого компонента.

Ключевые слова: генетический маркер, иммунитет, HLA-типирование, герпетические инфекции, бесплодие, супружеские пары.

Адрес для переписки:

Левкова Елена Анатольевна
680021, Россия, г. Хабаровск, ул. Серышева, 47,
ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный
университет путей сообщения.
Тел.: 8 (4212) 40-70-37 (служебн.).
E-mail: elenaalevkova@gmail.com

Contacts:

Elena A. Levkova
680021, Russian Federation, Khabarovsk, Serysheva str., 47,
Far Eastern State Transport University.
Phone: +7 (4212) 40-70-37 (office).
E-mail: elenaalevkova@gmail.com

Библиографическое описание:

Левкова Е.А., Савин С.З., Емельянова Э.Б., Смиренина И.В.
Генетические и инфекционные маркеры бесплодия // Инфекция
и иммунитет. 2018. Т. 8, № 2. С. 235–240. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
2-235-240

Citation:

Levkova E.A., Savin S.Z., Emelyanova E.B., Smirenina I.V. Genetic and
infectious markers of infertility // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 2, pp. 235–240. doi: 10.15789/2220-
7619-2018-2-235-240

© Левкова Е.А. и соавт., 2018

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2018-2-235-240>

GENETIC AND INFECTIOUS MARKERS OF INFERTILITY

Levkova E.A.^a, Savin S.Z.^b, Emelyanova E.B.^c, Smirenina I.V.^d

^a Far Eastern State Transport University, Khabarovsk, Russian Federation

^b Computer Centre of FEB RAS, Khabarovsk, Russian Federation

^c S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

^d Institute of Training of Health Professionals, Khabarovsk, Russian Federation

Abstract. The report presents the results of own research of the most important factors in the genesis of various forms of sterility. A married couples ($n = 50$) was examined with regard to possible etiological structure of these forms of pathology — infections of the family herpes (Herpes simplex types 1, 2, Cytomegalovirus hominis (CMV), Epstein–Barr virus (EBV) and genetic distribution for the second class of histocompatibility (HLA II class): HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1. The authors present own data on genetic typing of the couples for the second class of histocompatibility, which allow to correlate these data with clinical and laboratory associations with infectious agents (infections of the herpes family). The genetic characteristics that determine the reproductive ability of the couple are associated with susceptibility to certain infectious markers. It is shown that the dominant majority of couples determined the HLA-DRB1 gene, which is more frequently associated with infections of the herpes family. Despite the fact that the level of positive PCR results in the group of couples with primary infertility was higher than in couples with secondary sterility (100 and 92%, respectively), maximum titers of specific antibodies to infections of the herpes family, including the frequency of markers of exacerbation, definition of IgM was higher than in the group of couples with primary infertility, and significantly higher than in couples with normal fertility. So, this antigen histocompatibility (HLA-DRB1) is associated with significant frequency of sterility, especially the secondary one, and infectious contamination infections of the family of herpes — HSV 1, 2 types, CMV, EBV in the study group — couples with secondary infertility. Marker HLA-DRB1, the most frequent in couples with infertility, including idiopathic, associated in this group not only with significant contamination of infectious of the herpes family, but the presence of a chronic infectious process at the stage of reactivation. Conducted clinical and immunological studies clearly demonstrate the need for a comprehensive survey of women with disabilities in the system of immunogenesis with the mandatory assessment of the level of infectious (viral) contamination. Analysis of the results of their clinical and immunological studies allows us to propose an algorithm of complex examination in functional disorders in the system of immunogenesis, including the study of viral load as a necessary component.

Key words: genetic markers, immune status, HLA-typing, herpes infection, infertility, couples.

Введение

В условиях демографического кризиса в России и продолжающейся депопуляции населения актуальным остается вопрос об использовании всех ресурсов повышения рождаемости. Особое значение придается снижению частоты бесплодия, минимальный уровень которого в среднем составляет 10%, а критический, придающий проблеме общегосударственное значение, — 15% [10, 11]. Научные исследования, проведенные по эпидемиологии бесплодного брака, этиопатогенетическим аспектам данных нозологических форм стерильности, демонстрируют значительную роль иммунных факторов в генезе бесплодия, как у женщин, так и у мужчин. Изменения иммунологической толерантности по типу «реакции трансплантат против хозяина» при патологии гестационного процесса были описаны В.И. Говалло [2, 3, 4]. Антигены HLA II класса играют ключевую роль в развитии приобретенного иммунного ответа на антигены чужеродных белков, их основная физиологическая функция как генов иммунного ответа — обеспечение устойчивости человека к инфекциям. Есть предположения, что оборотной стороной устойчивости

к инфекциям являются аутоиммунные заболевания, подтверждающим признаком которых является наличие HLA-«маркеров» — определенных вариантов генов HLA класса II, ассоциированных с чувствительностью или устойчивостью к аутоиммунным заболеваниям. Еще одна важная физиологическая функция белков HLA II класса — их участие в репродуктивных процессах, результатом чего является рождение жизнеспособного, разнообразного в генетическом отношении потомства и, наоборот, снижение вероятности рождения детей от родителей, имеющих кровное родство или родителей с гомологичным набором вариантов генов HLA класса II. Следствием сходства родителей по вариантам генов HLA класса II является большая вероятность появления гомозиготного по генам HLA класса II потомства. Этот фактор является неблагоприятным с точки зрения естественного отбора [1]. Видимо поэтому природа выработала механизмы, препятствующие возможности появления такого потомства на каждом из этапов репродуктивного процесса. Есть также предположения, что эмбрион от гомологичных по генам HLA родителей недостаточно стимулирует супрессорные механизмы иммунитета, которые в течение физиологической беременности

блокируют иммунные реакции матери против эмбриона. Недостаточная супрессия этих иммунных реакций может привести к спонтанному аборту. Таким образом, генетические особенности, определяющие репродуктивные возможности семейной пары, ассоциируются и с чувствительностью к определенным инфекционным маркерам. Ведущее место в этиологии бесплодия отводится инфекционным агентам — герпесвирусам: вирусам простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типов, цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ). Причиной развития инфекционно-ассоциированных форм бесплодия являются нарушения в иммунной системе, которые варьируются от иммунокомпроментации до тяжелых вторичных иммунодефицитов. Ни в практической медицине, ни в научном мире нет единого мнения, как обследовать женщин с бесплодием на этапах прегравидарной подготовки. При этом самыми дискуссионными вопросами являются: 1) что включать в TORCH-комплекс; 2) как интерпретировать данные иммуноферментного анализа. В этой связи целью проспективного исследования стало изучение распределения генов HLA II класса среди семейных пар, страдающих различными формами стерильности, и их ассоциация с герпесвирусными инфекциями.

Материалы и методы

Проспективные исследования семейных пар с различными формами бесплодия и разной степенью инфекционной контаминации были начаты авторами в 2005 г. Основной клинической базой для проведения исследований была медицинская клиника ООО «Иммуно-реабилитационный центр». Общее количество семейных пар с бесплодием, представленных в данной статье — 50 (100 человек). Средний возраст супружеских пар — $32,93 \pm 4,84$ лет. Все женщины в исследовании были в возрасте от 25 лет и старше. Среднее количество лет первичной стерильности — $5,91 \pm 1,41$ (у 24 женщин), вторичной стерильности — $8,55 \pm 2,02$ (у 26 женщин). Обследование семейных пар проводилось согласно приложению к приказу МЗ РФ № 556н от 30 октября 2012 г. [11]. При исключении всех причин бесплодия и постановки диагноза «Бесплодие неясного генеза (N97)» семейным парам предлагалось проведение иммунотипирования по II классу гистосовместимости. Группу контроля составили 23 фертильные супружеские пары того же возраста. Отягощенный гинекологический и акушерский анамнез имели соответственно 30,4% (7 человек) и 21,7% (5 человек). Инфекционный индекс низкий, частота герпеса (лабиальный и генитальный вариант) — не более 1 раза в год у 9 семейных пар (39,1%).

По данным литературы [1, 6, 9, 10, 14], наибольшее значение в клинической практике имеют 3 гена HLA класса II: главный среди генов II класса ген DRB1 (более 600 аллельных вариантов), а также гены DQA1 (26 аллельных вариантов) и DQB1 (80 аллельных вариантов). На протяжении ряда лет авторами проводилась аналитическая работа по обследованию женщин с бесплодием на герпесвирусные инфекции.

Исследования проводились молекулярно-биологическими методами: сиквенс-специфических праймеров — при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) или гибридизация с мечеными олигонуклеотидными зондами — после окончания ПЦР. При этом из герпесвирусных инфекций в TORCH-комплекс входит не только ВПГ, но и ВЭБ. При комплексной программе обследования учитываются результаты ИФА с определением концентрации специфических антител (IgG и IgM) и их оценки в динамике с учетом периода полураспада IgG при серопозитивности обследуемого контингента [10, 12].

Оценка инфекционной контаминации и активности инфекционного процесса проводилась в динамике обследования (с учетом периода полураспада IgG) через 21 день. Оценка уровня специфических антител (IgG, IgM) к ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ, ВЭБ — проводилась методом ИФА, результаты ПЦР в биологическом материале (мазки) из цервикального канала, уретры, влагалища.

Методами для этиологических исследований на ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ и ВЭБ стали определение в ИФА специфических иммуноглобулинов IgG, IgM и исследования биологических субстратов (содержимое цервикального канала) методом ПЦР.

Результаты и обсуждение

При анализе полученных данных авторы исходили из основной интерпретации сопряжения генетических маркеров с разнообразными патонезологическими формами. Представленные в работе генетические маркеры имеют следующие ассоциации с известными примерами [1, 10].

Следует отметить, что наши исследования имеют новизну не только в части оценки частоты встречаемости «генетического» фактора у супружеских пар с бесплодием, но и в части оценки сопряжения данных маркеров с инфекционной контаминацией герпесвирусами. В классических источниках литературы [2, 3, 5, 14] чаще всего определяют HLA-фенотип супругов по антигенам I класса. При HLA-типировании, проведенном у партнеров с бес-

плодным браком была выявлена частичная гистосовместимость (индекс гистосовместимости превышал 0 на 50 (2 идентичных гена) и более процентов. Характеристика групп сравнения показана на рисунке.

В цикле работ, посвященных герпесвирусным инфекциям, мы неоднократно приводили свои результаты и данные отечественных и зарубежных авторов [1, 10, 13, 15] о запуске иммунопатологических реакций, направленных против организма человека и проявляющихся в виде вирусиндуцированной иммуносупрессии [2, 4, 12, 13]. Далее представлены полученные нами статистические данные по распределению специфических антител и позитивности в ПЦР. В группе супружеских пар с первичным бесплодием серопозитивность определялась в 100% случаев (24 семейные пары), со вторичным — 92% (26 семейных пар). В одной семейной паре из группы сравнения была установлена серонегативность к ЦМВ, частота инфекционной контаминации составила 95,65%.

При нормативных значениях титров специфических антител к ВПГ 1 и 2 типов, с учетом геометрической прогрессии, при хронических неактивных инфекционных процессах — IgG 1:800, IgM — отрицательные; результаты ПЦР исследования — отрицательные. При хронической латентной (неактивной) ВЭБ-инфекции

IgM не определялся к капсидному антигену (VCA), а уровень титров антител к IgG к VCA определялся в низких значениях.

IgG к раннему антигену (EA) имели как отрицательные, так и положительные значения — титры менее 1. IgG к ядерному или нуклеарному или позднему антигену (EBNA) определялись в диагностически незначимых титрах [7, 8]. В группах семейных пар с первичным и вторичным бесплодием результаты ПЦР у супругов (мужчин) были отрицательными. У семи женщин с первичным бесплодием определялась положительная реакция на ВПГ 1 и 2 типов (29,16%) в мазках цервикальном канале и во влагалище, у четырех пациенток диагностировались положительные реакции на ЦМВ (16,6%) в мазках цервикального канала. Результаты на ВЭБ были (точка пропущена) отрицательные. У пациенток с вторичным бесплодием (26 человек) положительный результат ПЦР на ВПГ 1 и 2 типов был получен в 11 случаях (42,3%) в мазках цервикального канала и во влагалище, при этом в 3 случаях из 11 положительный результат определялся в уретре. В группе супружеских пар (23) у одного мужчины ПЦР была положительная из уретры на ВПГ1,2 типов (4,34%). У всех женщин (23 человека) результаты ПЦР на герпесвирусные инфекции были отрицательными.

Необходимо отметить еще одну закономерность в соотношении результатов ИФА и ПЦР на герпесвирусные инфекции у описываемого контингента супружеских пар с различными типами бесплодия. В группе женщин с первичным бесплодием уровень титров специфических антител класса IgG был повышен к ВПГ 1 и 2 типа и ЦМВ и достигал 1:3200 в 21 случае (91,3%), а в динамике (через 42 дня) в 8 случаях уровень титров специфических антител увеличился и составил 1:6400. При этом у всех ПЦР-позитивных к ВПГ 1 и 2 типов и ЦМВ женщин IgM-антитела не определялись. Положительные значения IgM-антител по ВПГ 1 и 2 типов были зафиксированы у одной пациентки, и еще у одной определялись положительные значения IgM-антител к ЦМВ. В группе женщин со вторичным бесплодием были установлены аналогичные закономерности: ни у одной из пациенток с положительными результатами ПЦР к ВПГ 1 и 2 типов и ЦМВ не были выявлены IgM-антитела. При этом частота определения IgM-антител в этой группе была несколько выше, чем у женщин с первичным бесплодием: они определялись у 4 женщин (15,38%), в том числе у троих — к ВПГ 1 и 2 типов, у одной — к ЦМВ. Титры специфических антител у 7 пациенток определялись на уровне 1:3200 (26,92%), у остальных (19 женщин) на уровне 1:6400 и выше. В динамике через 42 дня у 2 пациенток титры увеличились до 1:12 800 (7,69%), у 9 жен-

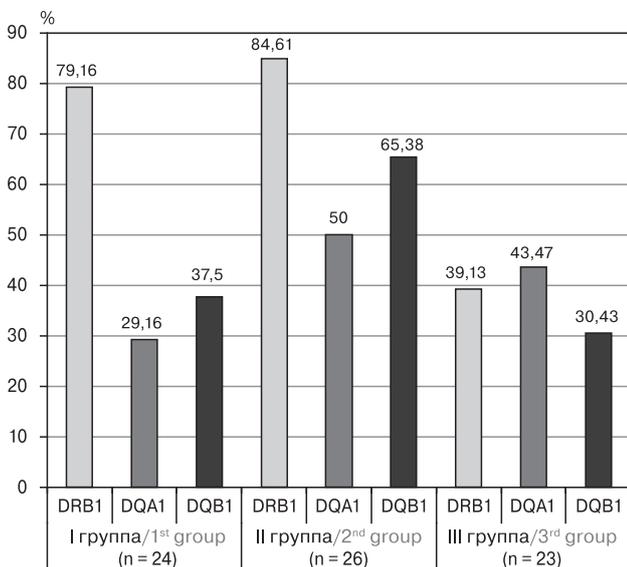


Рисунок. Частота распределения маркеров II класса гистосовместимости среди семейных пар

Figure. The frequency distribution of markers II class histocompatibility among couples

Примечания: I группа — группа с первичной стерильностью; II группа — группа с вторичными формами бесплодия; III группа — группа контроля.

Notes: I group — a group of primary sterility; II group — group with secondary forms of infertility; III group — control group.

щин — до 1:6400 (34,61%), у остальных титры сохраняли стабильно высокие значения в диапазоне от 1:3200 до 1:6400.

Отдельно необходимо остановиться на ВЭБ у пациенток с различными формами бесплодия. При изучении распределения специфических антител к ВЭБ, по соотношению которых можно определить стадию течения хронического инфекционного процесса, учитывались данные [10]. Уточняя характер распределения и количественные значения титров специфических антител к ВЭБ, нужно отметить и общие закономерности в группах сравнения. Во всех 73 семейных парах (из которых 23 пары — с неизменной фертильностью) при ИФА крови IgM-антитела не определялись. Из 146 человек (73 семейные пары) 139 (95,2%) были инфицированы, что соответствует данным литературы о значительном инфицировании населения земного шара герпесвирусами [10, 13, 15].

Особенности распределения заключались в следующем. В группе семейных пар с первичным бесплодием (24 семейные пары) IgG-антитела к Anti-VCA определялись у 18 человек (35,5%), к Anti-EA — у 26 человек (54,16%), к Anti-EBNA — у 47 человек (97,91%). При этом титры IgG-антител к Anti-EBNA не менее чем в 4 раза превышали нормативные значения и составляли 80 и более условных единиц. В 26 семейных парах со вторичным бесплодием IgG-антитела к Anti-VCA определялись у 20 человек (38,46%), к Anti-EA — у 29 человек (55,76%), к Anti-EBNA — у 49 человек (94,23%). При этом титры IgG-антител к Anti-EBNA также не менее чем в 4 раза превышали нормативные значения и составляли 80 и более условных единиц.

Третьим этапом исследования стало определение соотношения генетических маркеров

второго класса гистосовместимости со степенью инфекционной контаминации. Из 3 генов HLA класса II наибольшую частоту имел HLA-DRB1, ассоциированный, по данным литературы [1, 10, 14], с большим спектром патонозологий, в том числе с предрасположенностью к инфекционным заболеваниям.

На наш взгляд, параметры этого маркера имеют определенные особенности по отношению к инфекционной контаминации. Несмотря на то, что уровень положительных результатов ПЦР в группе семейных пар с первичным бесплодием был выше, чем в семейных парах со вторичной стерильностью (100 и 92% соответственно), максимальные значения титров специфических антител к герпесвирусным инфекциям, в том числе и частота маркеров обострения — IgM-антител, были выше, чем в группе семейных пар с первичным бесплодием, и значительно выше, чем в семейных парах с нормальной фертильностью. Следовательно, именно данный антиген гистосовместимости — HLA-DRB1 — ассоциируется со значительной частотой стерильности, особенно вторичной, и инфекционной контаминацией герпесвирусными инфекциями (ВПГ 1 и 2 типов, ЦМВ, ВЭБ) в данной группе исследования.

Таким образом, в работе представлены собственные данные о том, что определенные варианты генов HLA класса II ассоциированы, вероятно, с различными типами иммунного ответа. Маркер HLA-DRB1, наиболее часто встречающийся в семейных парах с бесплодием, в том числе и с идиопатическим, ассоциируется у данного контингента не только со значительной инфекционной контаминацией герпесвирусными инфекциями, но и наличием хронического инфекционного процесса в стадии реактивации.

Список литературы/References

1. Болдырева М.Н., Гуськова И.А., Богатова О.В., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Кабдулова Д.Д., Евсева И.В., Осокина И.В., Алексеев Л.П. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. II. Народы европейской части // Иммунология. 2006. Т. 27, № 4. С. 198–202. [Boldyreva M.N., Gus'kova I.A., Bogatova O.V., Yankevich T.E., Khromova N.A., Kabdulova D.D., Evseva I.V., Osokina I.V., Alexeev L.P. HLA-gene diversity among population of Russia and FIS. II. Populations of Euro-Asia. *Immunologiya = Immunology*, 2006, vol. 27, no. 4, pp. 198–202. (In Russ.)]
2. Говалло В.И. Иммунология репродукции. М.: Медицина, 1987. 304 с. [Govallo V.I. *Immunologiya reproduktivii [Immunology of reproduction]*. Moscow: Meditsina, 1987. 304 p.]
3. Говалло В.И. Почему мы не похожи друг на друга: очерки о биологической индивидуальности. М.: Знание, 1984. 192 с. [Govallo V. I. *Pochemu my ne pokhozhi drug na druga: ocherki o biologicheskoi individual'nosti [Why we don't like each other: essays on biological individuality]*. Moscow: Znanie, 1984. 192 p.]
4. Говалло В.И., Сидельникова В.М. Иммунизация беременных женщин аллогенными лимфоцитами мужа как метод профилактики самопроизвольных выкидышей // Акушерство и гинекология. 1983. № 12. С. 25–27. [Govallo V.I., Sidelnikova V.M. Immunization of pregnant women allogeneic lymphocytes husband as a method of preventing spontaneous abortion. *Akusherstvo i ginekologija = Obstetrics and Gynecology*, 1983, no. 12, pp. 25–27. (In Russ.)]
5. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. Одесса: АстроПринт, 1999. 603 с. [Drannik G.N. *Klinicheskaya immunologiya i allergologiya [Clinical immunology and allergology]*. Odessa: AstroPrint, 1999. 603 p.]
6. Есина Е.В., Логина Н.Ю., Аляутдина О.С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы // Русский медицинский журнал. Акушерство и гинекология. 2013. № 1. С. 44–48. [Esina E.V., Logina N.Yu., Alyautdina O.S. Role of immune interactions in the development of infertility: a review of the literature. *Russkii meditsinskii zhurnal. Akusherstvo i ginekologiya = Russian Medical Journal. Obstetrics and Gynecology*, 2013, no. 1, pp. 44–48. (In Russ.)]

7. Левкова Е.А. Иммунодефицитные болезни: классификационные вопросы. Хабаровск: Изд-во «Дальпечать», 2005. 130 с. [Levkova E.A. Immunodefitsitnye bolezni — klassifikatsionnye voprosy [Immunodeficiency diseases: classification questions]. Khabarovsk: Publishing house “Dal’pechat”, 2005. 130 p.]
8. Левкова Е.А., Савин С.З. Герпес-индуцированные иммунодефицитные болезни у детей (на примере 4 типа герпеса) // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 5. [Levkova E.A., Savin S.Z. Herpes-induced immunodeficiency disorders in children (for case of human herpes virus type 4). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*, 2016, no. 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25135> (01.02.2017) (In Russ.)]
9. Лобзин Ю.В., Белозеров Е.С., Беляева Т.В., Волжанин В.М. Вирусные болезни человека. СПб.: СпецЛит, 2015. 399 с. [Lobzin Yu.V., Belozеров E.S., Belyaeva T.V., Volzhanin V.M. Virusnye bolezni cheloveka [Viral diseases of man]. *St. Petersburg: SpetsLit*, 2015. 399 p.]
10. Малашенкова И.К., Дидковский Н.А., Сарсания Ж.Ш., Жарова М.А., Литвиненко Е.Н., Щепеткова И.Н., Чистова Л.И., Пичужкина О.В., Гусева Т.С., Паршина О.В. Клинические формы хронической Эпштейн–Барр-вирусной инфекции: вопросы диагностики и лечения // Лечащий врач. 2003. № 9. С. 32–38. [Malashenkova I.K., Didkovsky N.A., Sarsania J.S., Zharova M.A., Litvinenko E.N., Shepetkov N.I., Chistova L.I., Pichuzhkina O.V., Guseva T.S., Parshina O.V. Clinical forms of chronic Epstein–Barr virus infection: diagnosis and treatment. *Lechashchii vrach = The Attending Physician*, 2003, no. 9, pp. 32–38. (In Russ.)]
11. Об утверждении стандарта медицинской помощи при бесплодии с использованием вспомогательных репродуктивных технологий: Приложения к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 октября 2012 г. № 556н. [Ob utverzhdenii standarta meditsinskoi pomoshchi pri besplodii s ispol’zovaniem vspomogatel’nykh reproductivnykh tekhnologii: Prilozheniya k prikazu Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii No. 556n. [On approval of the standard of care for infertility using assisted reproductive technologies: Application to the order of Ministry of health of the Russian Federation no. 556n]. 30 October 2012.]
12. Ринчиндоржиева М.П., Колесников С.И., Сутурина Л.В., Лабыгина А.Б., Даржаев З.Ю., Шипхинеева Т.Н., Дашиев Б.Г., Цыренов Т.Б. Эпидемиология женского бесплодия городского населения республики Бурятия // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, 2011, № 4–2. С. 295–298. [Rinchindorzhiyeva M.P., Kolesnikov S.I., Suturina L.V., Labigina A.V., Darzhayev Z.J., Shiphineyeva T.I., Dashiev B.G., Tsirenov T.B. Epidemiological of women infertility among urban population of the republic of Buryatia. *Byulleten’ Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Centre of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2011, no. 4–2, pp. 295–298. (In Russ.)]
13. Brunham R.C., Gottlieb S.L., Paavonen J. Pelvic inflammatory disease: from diagnosis to prevention. *N. Engl. J. Med.*, 2015, vol. 372, pp. 2039–2048. doi: 10.1056/NEJMra1411426
14. Cruchley A.T., Williams D.M., Niedobitek G. Epstein–Barr virus: biology and disease. *Oral Dis.*, 1997, no. 3, suppl. 1, pp. S153–S156.
15. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis. Eds. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K. *Cambridge: Cambridge University Press*, 2007. 1432 p. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47376> (01.02.2017)

Авторы:

Левкова Е.А., д.м.н., профессор, директор психологического центра ФГБОУ ВО Дальневосточный государственный университет путей сообщения, г. Хабаровск, Россия;
Савин С.З., к.т.н., зав. лабораторией медицинской информатики ФБГУН «Вычислительный центр ДВО РАН, г. Хабаровск, Россия;
Емельянова Э.Б., зав. клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ Городская клиническая больница им. С.П. Боткина, Москва, Россия;
Смиренина И.В., к.м.н., доцент кафедры общей врачебной практики и профилактической медицины КГБОУ ДПО Институт повышения квалификации специалистов здравоохранения, г. Хабаровск, Россия.

Authors:

Levkova E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Psychological Center, Far Eastern State Transport University, Khabarovsk, Russian Federation;
Savin S.Z., PhD (Engineering), Head of the Laboratory of Medical Informatics, Computer Centre of Far-Eastern Branch of RAS, Khabarovsk, Russian Federation;
Emelyanova E.B., Head of the Clinical Diagnostic Laboratory, S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation;
Smirenina I.V., PhD (Medicine), Associate Professor of General Medical Practice And Preventive Medicine Department, Institute of Health Professionals Training, Khabarovsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 31.01.2018
 Принята к печати 02.03.2018

Received 31.01.2018
 Accepted 02.03.2018

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. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения, регламентированного международными правилами (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.).

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, т.е. ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица предоставляется отдельным файлом. Таблицы нумеруются арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. 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

Антипова А.Ю.	230	Зарубаев В.В.	195	Рубакова Э.И.	169
Апт А.С.	169	Капина М.А.	169	Савин С.З.	235
Беленюк В.Д.	201	Капкаева Р.Х.	150	Савченко А.А.	201
Беляков Н.А.	139	Коленчукова О.А.	157	Скиба А.А.	107
Бичурина М.А.	230	Кругляк С.П.	187	Скляр Л.Ф.	187
Блох А.И.	127	Кудрявцев И.В.	201	Смиренина И.В.	235
Боева Е.В.	139	Куляшова Л.Б.	230	Соколов А.В.	211
Борисов А.Г.	201	Кулова Е.А.	223	Солнцев Л.А.	223
Боровская Н.А.	187	Лаврентьева И.Н.	195, 230	Старикова Э.А.	211
Бурова Л.А.	211	Лебедева А.М.	211	Суворова М.А.	219
Васильев В.Б.	211	Левкова Е.А.	235	Теселкин И.В.	195
Васильева С.В.	195	Литвинова И.С.	157	Токаревич Н.К.	219
Вепринцева В.М.	195	Логунова Н.Н.	169	Тотолян Арег А.	230
Вишневский Б.И.	175	Майоров К.Б.	169	Уткин О.В.	223
Галочкина А.В.	195	Маничев С.А.	175	Филатова Е.Н.	223
Гаршинина А.В.	195	Маничева О.А.	175	Фрейдлин И.С.	211
Гвоздев И.И.	157	Маркелова Е.В.	187	Черданцев Д.В.	201
Головин А.С.	211	Матвеева Л.В.	150	Чудайкин А.Н.	150
Горбачева Н.Н.	157	Мельникова Н.Н.	175	Шапарь А.О.	219
Гуан В.-С.	119	Мишанина Л.С.	150	Шен С.-Ф.	119
Гуменюк А.С.	107	Морковник А.С.	195	Шпынов С.Н.	107
Диваева Л.Н.	195	Панферова Ю.А.	219	Egorova S.A.	163
Догондзе М.З.	175	Пасечник О.А.	127	Kaftyreva L.A.	163
Ду Дж.-Ф.	119	Первова О.В.	201	Makarova M.A.	163
Елисеева В.С.	187	Поздниченко Н.Н.	107	Matveeva Z.N.	163
Емельянова Э.Б.	235	Преснякова Н.Б.	223	Suzhaeva L.V.	163
Есаулкова Я.Л.	195	Процак Е.С.	195	Voitenkova E.V.	163
Железнова Н.В.	230	Пузырева Л.В.	119	Zabrovskaja A.V.	163
				Zueva E.V.	163

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активность <i>in vivo</i>	195	лекарственная чувствительность	175	специфические антитела	230
антиретровирусная терапия	139	макрофаги	211	субтипы	127
апоптоз	119	маркер	235	супружеские пары	235
аргининдеминаза	211	метод ИФА	230	тест-системы	230
атрофический гастрит	150	моноцитарный хемоаттрактантный		туберкулез	169
бесплодие	235	протеин-1	150	туберкулез легких	175
боррелии	219	моноциты	201	фенотип	201
ВААРТ	187	моноциты крови	157	формальный анализ строя	107
ВГЧ-6	223	мутации	187	химиотерапия	195
вирулентность	107	нейтрофилы	119	циркулирующие рекомбинантные	
вирус клещевого энцефалита	219	обсемененность	157	формы	127
ВИЧ	139	опportunистические заболевания	139	цитокины	187
ВИЧ-1	127	осложнения	139	экология	107
ВИЧ-инфекция	187	патология легких	169	экспериментальная модель	169
внелегочный туберкулез	175	перекрестная реактивность	230	эпидемиология	107
генетический маркер	235	перитонит	201	эрозивно-язвенное поражение	
геном	107	популяционный состав	201	желудка	157
геномсистематика	107	популяционный состав		язвенная болезнь желудка	150
генотипы	127	клеток крови	223	antimicrobial resistance	163
герпетические инфекции	235	производные бензимидазола	195	«capture» формат	230
градиентный бустинг	223	противовирусные средства	195	<i>Comamonas kerstersii</i>	163
гранулоциты	201	проточная цитометрия	223	DCreg	169
грипп	195	ПЦР-диагностика	219	<i>Helicobacter pylori</i>	150, 157
гриппозная инфекция	195	рак желудка	150	HLA-типирование	235
иммунитет	139, 223, 235	распространенность	127	IL-2	187
иммуносупрессия	119	регуляция	201	«indirect» формат	230
интерлейкины	119	респираторный взрыв	201	iNOS	211
инфекционный мононуклеоз	223	риккетсии	107, 219	MALDI-TOF	163
инфицированность	219	риккетсиозы	107	microbiome of the intestines	163
кислородозависимый фагоцитоз	157	сепсис	119	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	175
клещевые патогены	219	синдром восстановления		NO	211
клинические штаммы	175	иммунитета	139	non-fermenting bacteria	163
корь	230	систематика	107	<i>S. pyogenes</i>	211
лекарственная резистентность	187	скорость роста	175	Treg	169

Иллюстрации к статье «Протективная активность новых производных бензимидазола при экспериментальной гриппозной инфекции» (авторы: В.В. Зарубаев, С.В. Васильева, Я.Л. Есаулкова, А.В. Гаршинина, В.М. Вепринцева, А.В. Галочкина, Е.С. Процак, И.В. Теселкин, А.С. Морковник, Л.Н. Диваева, И.Н. Лаврентьева) (с. 195–200)

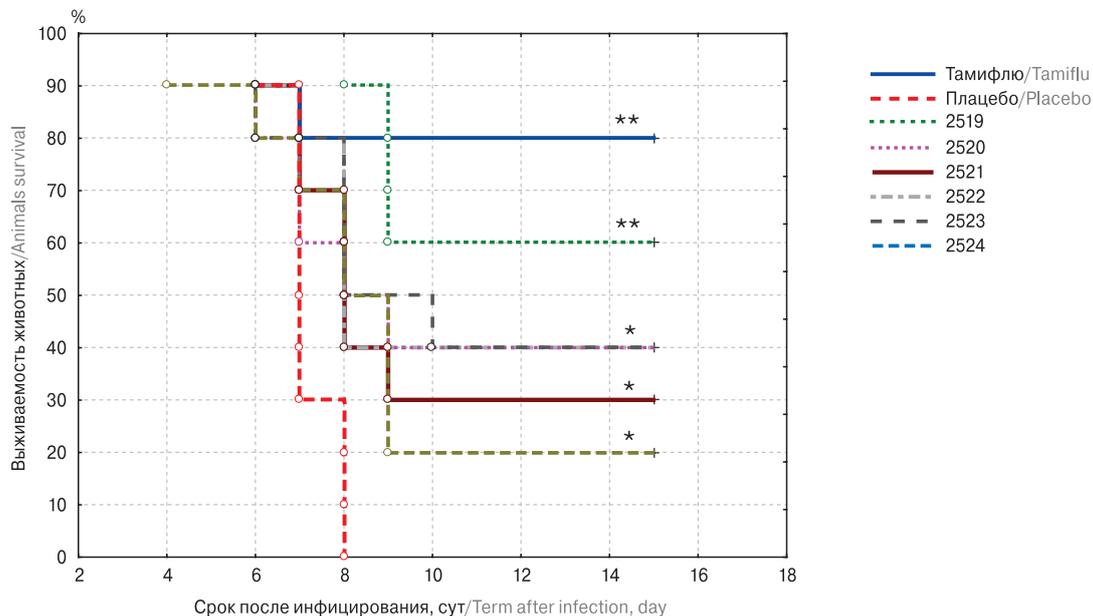


Рисунок 2. Динамика гибели животных в ходе гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09, в условиях применения химиопрепаратов

Figure 2. Dynamics of mortality of animals in the course of influenza pneumonia caused by virus A/California/7/09 (H1N1)pdm09, treated with aminobenzimidazoles

Примечание. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,001$.

Note. * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.001$.

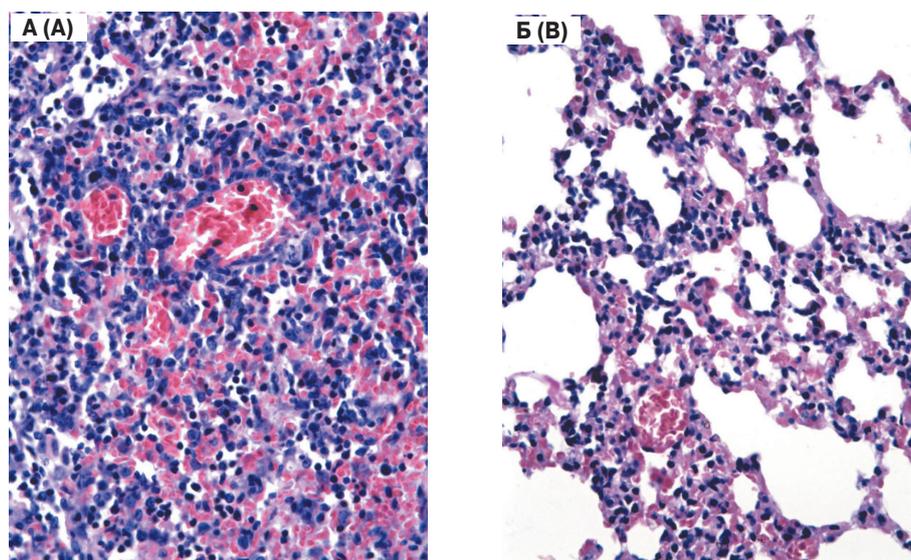


Рисунок 3. Структура легких мыши на 5 сутки после инфицирования вирусом гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09 в условиях применения плацебо (А) и производного бензимидазола 2519 (Б)

Figure 3. Morphological structure of mouse lungs at day 5 post infecting with influenza virus A/California/7/09 (H1N1)pdm09 in placebo group (A) and in the group treated with benzimidazole derivative 2519 (B)

Примечание. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 400$

Note. Haematoxylin-eosin, $\times 400$

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

