

2018

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

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

ЖУРНАЛ «ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ»

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

ИНФЕКЦИЯ И ИММУНИТЕТ

июль–сентябрь

2018, том 8

№ 3

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
Лоузири Э. профессор, директор Института Пастера Туниса, Тунис
Львов Д.К. д.м.н., профессор, академик РАН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия
Мануссакис М. директор Института Пастера Греции, Афины, Греция
Медуницын Н.В. д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Москва, Россия
Михайлов М.И. д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией вирусных гепатитов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова; зав. кафедрой микробиологии и вирусологии Российского университета дружбы народов, Москва, Россия
Найденски Х. д.м.н., профессор, директор Института микробиологии им. Стефана 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.
Тел.: (812) 233-08-58.

Издательство НИИЭМ имени Пастера

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел./факс: (812) 232-07-42.
E-mail: izdatelstvo@pasteurorg.ru

Типография ООО «Аллегро»

196084, Санкт-Петербург,
ул. Коли Томчака, 28.
Тел./факс: (812) 388-90-00.

Подписано в печать 19.09.2018 г. Формат 60 x 90 1/8.
Печать офсетная. Усл.-печ. л. 19.
Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.).
Заказ № 1279

© 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)

July–September

2018, volume 8

No. 3

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.
Tel.: (812) 233-08-58.

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 Allegro Printing House

196084, Russian Federation, St. Petersburg,
Koli Tomchaka str., 28.
Phone/fax: (812) 388-90-00.

Passed for printing 19.09.2018. Print format 60 x 90 1/8.
Offset printing. Printed sheets 19.
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

Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Н.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Борисова О.Ю., Алешкин А.В., Урбан Ю.Н., Борисова А.Б., Воропаев А.Д.
РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА (TLRs) В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН, В РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРИ ВНУТРИУТРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ 251

Быков А.С., Караулов А.В., Цомартова Д.А., Карташкина Н.Л., Горячкина В.Л., Кузнецов С.Л., Стоногина Д.А., Черешнева Е.В.
М-КЛЕТКИ — ОДИН ИЗ ВАЖНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ИНИЦИИИ ИММУННОГО ОТВЕТА В КИШЕЧНИКЕ 263

Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валеева Ю.В., Гуляев П.Е.
МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *HELICOBACTER PYLORI* С ЭПИТЕЛИЕМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА. I. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ УСПЕШНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ 273

Костинов А.М., Костинов М.П.
ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ КОКЛЮШЕМ И ЭФФЕКТ ОТ РЕВАКЦИНАЦИИ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО И ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА 284

Мусин Х.Г.
АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЗАМЕНА ТРАДИЦИОННЫМ АНТИБИОТИКАМ 295

Еремеев В.В., Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С., Эргешова А.Э., Багиров М.А.
МикроРНК И ТУБЕРКУЛЕЗ 309

Оригинальные статьи

Бондарева Н.Е., Моргунова Е.Ю., Зигангирова Н.А., Шапкин Ю.Г., Чалык Ю.В., Чалык Р.Ю.
ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *S. TRACNOMATIS* И *S. PNEUMONIAE*, У БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА 316

Харченко Е.П.
ВИРУС ИСПАНСКОГО ГРИППА: ШТРИХИ К ПОРТРЕТУ СПУСТЯ 100 ЛЕТ 325

Туранов А.О., Никитин А.А., Андаев Е.И.
ИММУННАЯ ПРОСЛОЙКА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У НАСЕЛЕНИЯ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ 335

Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимировна Н.П., Мамаева Т.А.
ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА НА СТРУКТУРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ И КРАСНУХОЙ 341

Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Матвеева З.Н., Войтенкова Е.В.
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ И РОССИИ (САНКТ-ПЕТЕРБУРГ) 349

Маснавиева Л.Б., Кудаева И.В.
МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПОДРОСТКОВ С ИНВАЗИЕЙ ЛЯМБЛИЯМИ 355

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Воронина И.С., Борисова А.Б., Шамшева О.В., Афанасьев С.С., Власов Е.В., Алешкин В.А.
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ КОКЛЮШЕМ 361

Краткие сообщения

Савченко А.А., Борисов А.Г., Черданцев Д.В., Первова О.В., Кудрявцев И.В., Гвоздев И.И., Мошев А.В.
ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА И АКТИВНОСТИ NAD(P)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ СЕПСИСА 369

Долмашкина А.С., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В.
ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ssp. *BULGARICUS* НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА ФАГОЦИТОЗА 377

Лаврентьева И.Н., Хамитова И.В., Слита А.В., Левковский А.Е., Диало А.А., Диало А.К., Соу Т.С., Найденова Е.В., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М.
ВЛИЯНИЕ КОИНФИЦИРОВАНИЯ PVB19 И *PLASMODIUM FALCIPARUM* НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ МАЛЯРИИ 383

Микшис Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Комиссаров А.В., Германчук В.Г., Попов Ю.А.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ПРОТОТИПА РЕКОМБИНАНТНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ТРЕБОВАНИЯМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ 388

Правила для авторов 393

Авторский указатель 396

Предметный указатель 396

CONTENTS

Reviews

Karaulov A.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L., Voropaeva E.A., Afanasiev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Borisova O.Yu., Aleshkin A.V., Urban Yu.N., Borisova A.B., Voropaev A.D.
THE ROLE OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS (TLRs) IN MAINTAINING THE HOMEOSTASIS OF THE FEMALE GENITAL TRACT IN DEVELOPING PREGNANCY AND INTRAUTERINE INFECTION 251

Bykov A.S., Karaulov A.V., Tsomartova D.A., Kartashkina N.L., Goriachkina V.L., Kuznetsov S.L., Stonogina D.A., Cheresheva Ye.V.
M CELLS ARE THE IMPORTANT POST IN THE INITIATION OF IMMUNE RESPONSE IN INTESTINE 263

Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E.
MECHANISMS OF INTERRACTION OF *HELICOBACTER PYLORI* WITH EPITHELIUM OF GASTRIC MUCOSA. I. PATHOGENIC FACTORS PROMOTING SUCCESSFUL COLONIZATION 274

Kostinov A.M., Kostinov M.P.
PERTUSSIS INCIDENCE AND THE EFFECT OF REVACCINATION OF PRESCHOOL AND SCHOOL CHILDREN 284

Musin Kh.G.
ANTIMICROBIAL PEPTIDES – A POTENTIAL REPLACEMENT FOR TRADITIONAL ANTIBIOTICS 295

Eremeev V.V., Evstifeev V.V., Shepelkova G.S., Ergeshova A.E., Bagirov M.A.
MicroRNA AND TUBERCULOSIS 309

Original articles

Bondareva N.E., Morgunova E.Yu., Zigangirova N.A., Shapkin Yu.G., Chalyk Yu.V., Chalyk R.Yu.
IDENTIFICATION MARKERS OF INFECTION DUE TO *C. TRACHOMATIS* AND *C. PNEUMONIAE*, IN PATIENTS WITH DISEASES OF THE GASTROINTESTINAL TRACT 316

Kharchenko E.P.
THE SPANISH INFLUENZA VIRUS: TREATS TO THE PORTRAIT AFTER 100 YEARS 325

Turanov A.O., Nikitin A.Y., Andaev E.I.
IMMUNE INTERLAYER TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN HUMAN POPULATION OF TRANSBAIKALIA AS AN INDICATOR OF NATURAL FOCI ACTIVITY 335

Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A.
INFLUENCE OF POPULATION IMMUNITY PECULIARITIES ON THE STRUCTURE OF MEASLES AND RUBELLA PREVALENCE 341

Egorova S.A., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zbrovskaia A.V., Matveeva Z.N., Voitenkova E.V.
ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROBACTERIACAE* ISOLATED FROM INTESTINAL MICROBIOTA OF RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIA (SAINT PETERSBURG) 349

Masnavieva L.B., Kudaeva I.V.
MODIFYING EFFECT OF INHALATION CHEMICAL LOAD ON THE CONTENT OF CYTOKINES AND IMMUNOGLOBULINS IN ADOLESCENTS WITH LAMBLIA INFECTION 355

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Voronina I.S., Borisova A.B., Shamsheva O.V., Afanasiev S.S., Vlasov E.V., Aleshkin V.A.
EFFICIENCY OF APPLICATION OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION AT INSPECTION OF PATIENTS WITH WHOOPING COUGH 361

Short communications

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V.
FEATURES OF THE PHENOTYPE AND NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES ACTIVITY IN NEUTROPHIL BY PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS IN PROGNOSIS FOR SEPSIS DEVELOPMENT 369

Dolmashkina A.S., Gorelnikova E.A., Karpunina L.V.
INFLUENCE OF THE LECTIN *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ssp. *BULGARICUS* ON ACTIVITY OF THE PROCESS OF PHAGOCYTOSIS 377

Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K., Sow T.C., Naydenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M.
IMPACT OF COINFECTION OF PV B19 ON THE COURSE AND PROGNOSIS OF MALARIA CAUSED BY *PLASMODIUM FALCIPARUM* 383

Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A.
COMPLIANCE OF ANTHRAX RECOMBINANT VACCINE PROTOTYPE WITH THE REQUIREMENTS TO IMMUNE-BIOLOGICAL PREPARATIONS 388

Instructions to Authors 393

Author index 396

Subject index 396

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА (TLRs) В ПОДДЕРЖАНИИ ГОМЕОСТАЗА ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН, В РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ И ПРИ ВНУТРИУТРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.В. Караулов¹, С.С. Афанасьев², В.А. Алешкин², Н.Л. Бондаренко¹,
Е.А. Воропаева², М.С. Афанасьев¹, Ю.В. Несвижский¹, О.Ю. Борисова²,
А.В. Алешкин², Ю.Н. Урбан², А.Б. Борисова², А.Д. Воропаев²

¹ ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

² ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

Резюме. Целью представленного систематического обзора литературы является обобщение данных о роли TLRs в поддержании гомеостаза гениталий женщин, физиологического развития беременности, в обеспечении антиинфекционной резистентности беременных с внутриутробной инфекцией. Обоснована значимость TLRs гениталий женщин как необходимого и определяющего фактора в реакции на различные изменения в окружающей среде, а также в ответе за изменения в метаболизме, структурном или энергетическом, в поддержании антиинфекционной резистентности и гомеостаза. Являясь универсальными регуляторами жизнедеятельности организма, TLRs, совместно с другими рецепторами врожденного иммунитета, обеспечивают поддержание общей реактивности и антиинфекционной резистентности на физиологическом уровне. При физиологически развивающейся беременности на фоне иммунодепрессии в ответ на беременность TLRs при контакте с инфекционными и неинфекционными патогенами стимулируют выработку неспецифических факторов адаптивного иммунитета (дефензины, кателицидины и гистатины и др.), которые совместно с врожденными неспецифическими факторами лизоцимом, комплементом, пропердином и др. поддерживают антиинфекционную резистентность гениталий женщин на высоком уровне в начале инфекционного процесса. Возможные нарушения развития беременности могут сопровождаться изменениями реакции TLRs на инфекционные и неинфекционные факторы вплоть до гиперреакции, чрезмерным воспалительным процессом или апоптозом клеток, что требует адекватного ведения беременности. При внутриутробной инфекции установлена значимость влияния патогенов инфекционного и неинфекционного генеза опосредованно через TLRs на гомеостаз организма, на формирование нарушений в антиинфекционной резистентности на организменном и местном уровнях с выявлением новых патофизиологических и иммунологических па-

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 (499) 747-64-84 (служебн.); 8 916 147-19-60 (моб.).
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Borisova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (499) 747-64-84 (office); +7 916 147-19-60 (mobile).
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Библиографическое описание:

Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Н.Л.,
Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Борисова О.Ю.,
Алешкин А.В., Урбан Ю.Н., Борисова А.Б., Воропаев А.Д. Роль
рецепторов врожденного иммунитета (TLRs) в поддержании
гомеостаза генитального тракта женщин, в развитии беременности
и при внутриутробной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8,
№ 3. С. 251–262. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-251-262

Citation:

Karaulov A.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L.,
Voropaeva E.A., Afanasiev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Borisova O.Yu.,
Aleshkin A.V., Urban Yu.N., Borisova A.B., Voropaev A.D. The role of innate
immunity receptors (TLRs) in maintaining the homeostasis of the female
genital tract in developing pregnancy and intrauterine infection // Russian
Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3,
pp. 251–262. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-251-262

тогенетических механизмов развития патологических процессов. Инфекция является одним из основных факторов, оказывающих влияние на изменение экспрессии TLRs во внутриутробном и постнатальном периодах развития. ВУИ представляет собой проникновение микроорганизмов в ткани плода и его заражение. При этом угнетение функциональной активности TLRs сопровождается непосредственным воздействием патогена на ткани, а при гиперреакции TLRs на патогены выявляется выраженная воспалительная реакция у плода. Уровень экспрессии TLRs прямо коррелирует с тяжестью процесса, что позволяет рассматривать их как ранние маркеры инфекции. В зависимости от природы патогена наблюдается усиление экспрессии того или иного TLRs. Объективизируются объяснения отсутствия симптоматики, возможность атипичных проявлений, бессимптомного течения инфекции.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, беременность, физиологическое течение беременности, адаптивный иммунитет, физиологическая иммунодепрессия, внутриутробная инфекция, гомеостаз.

THE ROLE OF INNATE IMMUNITY RECEPTORS (TLRs) IN MAINTAINING THE HOMEOSTASIS OF THE FEMALE GENITAL TRACT IN DEVELOPING PREGNANCY AND INTRAUTERINE INFECTION

Karaulov A.V.^a, Afanasiev S.S.^b, Aleshkin V.A.^b, Bondarenko N.L.^a, Voropaeva E.A.^b, Afanasiev M.S.^a, Nesvizhsky Yu.V.^a, Borisova O.Yu.^b, Aleshkin A.V.^b, Urban Yu.N.^b, Borisova A.B.^b, Voropaev A.D.^b

^a I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

^b G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of the present systematic literature review is to summarize data on the role of TLRs in maintaining homeostasis of the female genitals, in maintaining the physiological development of pregnancy, provision of anti-infective resistance in pregnant women with intrauterine infection. The review substantiates the importance of TLRs of female genitals as a necessary and determining factor in the reaction to various changes in the environment, and also responsible for changes in metabolic, structural, or energy, in the maintenance of anti-infective resistance and homeostasis. As universal regulators of vital activity of organism TLRs in conjunction with other receptors of innate immunity provide maintaining the general reactivity and anti-infective resistance at the physiological level. In physiologically developing pregnancy in a background of immunosuppression in response to pregnancy TLRs during contact with infectious and non-infectious pathogens stimulate the production of nonspecific adaptive immunity factors (defensins, cathelicidins, histatines, etc.), which together with the non-specific innate factors lysozyme, complement, properdin, etc. support anti-infective resistance of the female genitals at a high level at the beginning of the infectious process. Possible violations of the development of pregnancy may be accompanied by changes in the response of TLRs to infectious and non-infectious factors until hyper-reaction, excessive inflammation or apoptosis, which requires adequate management of pregnancy. Was established the significance of the influence of pathogens of infectious and noninfectious origin in intrauterine infection indirectly through TLRs in the homeostasis of the organism, on the formation of breaches in anti-infective resistance at the organism and community level the identification of new pathophysiological and immunological pathogenetic mechanisms of development of pathological processes. IUI is a penetration of microorganisms into the tissues of fetus and it's infection. The inhibition of the functional activity of TLRs is accompanied by the direct effect of the pathogen on the tissues, and during hyper-reaction of TLRs to pathogens revealed a pronounced inflammatory response in the fetus. The level of expression of TLRs correlates directly with the severity of the process that can be considered as early markers of infection. Depending on the nature of the pathogen an increased expression of one or the other TLRs is observed. Explained the lack of symptoms, the possibility of atypical manifestations, the asymptomatic course of infection.

Key words: Toll-like receptors, pregnancy, the physiological course of pregnancy, adaptive immunity, physiological immunosuppression, intrauterine infection, homeostasis.

Организм человека обладает мощной врожденной и адаптивной системами иммунной защиты, скоординированное функционирование которых поддерживает гомеостаз организма и препятствует развитию патологии инфекционного и неинфекционного генеза на любой стадии развития, независимо от пути поступления возбудителя или патогена иной природы, а также уничтожение и элиминацию чужеродных веществ и агентов, что способствует поддержанию гомеостаза организма. Представляет научно-практический интерес обобщение данных литературы о роли TLRs в поддержании гомеостаза гениталий женщин, в поддержании физиологи-

ческого развития беременности, в обеспечении антиинфекционной резистентности беременных с внутриутробной инфекцией. Последняя довольно часто регистрируется в медицинской практике акушера-гинеколога [17, 18].

TLRs гениталий женщин

Слизистая оболочка женских половых путей является сложной системой, уникальность которой заключается в способности сохранять баланс между необходимостью и адекватностью иммунного ответа на патоген и иммунологической толерантностью к собственной микро-

флоре и антигенам развивающегося плода [37]. Доказана экспрессия TLRs в эпителии эндометрия и цервикального канала [36]. Экспрессия TLR1 и TLR6 присутствует в эпителиальных клетках маточных труб, эндометрии, эндоцервиксе, эктоцервиксе и влагалище. Кроме того, TLR1 экспрессируется маточными натуральными киллерами, эндотелиоцитами, гладкомышечными клетками шейки матки и миометрии. TLR6 экспрессируется маточными натуральными киллерами и стромальными фибробластами влагалища. Экспрессия TLR2 выявлена в эпителии фаллопиевых труб, эндометрия, шейки матки и влагалища, а также в гладкомышечных клетках шейки матки и влагалища, клетках стромы эндометрия и маточных натуральных киллерах [24]. Экспрессия TLR4 выявлена в шейке матки и влагалище, гладкомышечных клетках матки, стромальных клетках эндометрия и маточных натуральных киллерах, эпителиоцитах маточных труб [24, 82]. TLR3 экспрессируется в стромальных фибробластах влагалища и шейки матки, эпителии маточных труб, эндометрии, а также маточных натуральных киллерах. Экспрессия TLR5 отмечена в шейке матки, эндо- и эктоцервиксе, слизистой влагалища, гладкомышечных и эндотелиальных клетках, маточных натуральных киллерах эндометрия, эпителиоцитах маточных труб [50, 58, 59]. TLR7 экспрессируются маточными натуральными киллерами. TLR7 и TLR8 выявлены в эпителиоцитах эндометрия и шейки матки, фаллопиевых труб, влагалища, строме эндометрия [45]. TLR9 экспрессируются в эпителиоцитах влагалища, шейки матки, эндометрия фаллопиевых труб, строме эндометрия, однако отсутствует в натуральных маточных киллерах [45, 47]. Экспрессия TLR10 установлена только в эпителии маточных труб и натуральных маточных киллерах [91].

Известно, что экспрессия TLR зависит от уровня половых гормонов [71]. Экспрессия TLR2 и TLR6 значительно увеличивается в секреторную фазу менструального цикла [24]. Установлено, что экспрессия мРНК TLR2, TLR3, TLR4 и TLR9 выше в перименструальный период [48]. Выработка провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию лигандами TLR2, TLR4, TLR5 снижается в фолликулярную фазу цикла, а TLR6 и TLR8 — в лютеиновую. Экспрессия TLR3 и TLR7 не зависит от фазы менструального цикла [73].

TLRs способны распознавать условно-патогенную микрофлору женских половых путей, в частности, гемолитический стрептококк [67]. Одной из вероятных причин снижения экспрессии TLRs считают длительное воздействие на TLRs бактериальных эндотоксинов. Описано отсутствие иммунного ответа у моноцитов и нейтрофилов при длительной экспозиции эндотоксинов и показано, что этот механизм реализуется через систему сигнальных рецепторов

[60, 68, 92]. Этот феномен носит название «эндотоксиновой толерантности». Нарушение экспрессии TLRs способствует хронизации любых инфекционных процессов [72].

TLRs увеличивают локальный синтез провоспалительных цитокинов под действием микроорганизмов в эпителии цервикального канала [36]. TLRs выполняют регулируемую роль в запуске и последующей реализации ответа на инфекционные агенты. После распознавания консервативных молекулярных образцов различных патогенов, TLRs запускают локальный синтез цитокинов, простагландинов, хемокинов и противомикробных пептидов [27]. В слизистой генитального тракта нейтрофилы выделяют большое количество молекул и противомикробных пептидов (дефенсинов), которые оказывают прямое воздействие на инфекционный агент [91]. Пациенты с дефицитом белка MyD88 имеют высокий риск развития осложнений, вызванных грамположительной микрофлорой [86]. TLR2 распознают фосфолипоманнан *Candida albicans* [70]. TLR2 также идентифицирует вирусы простого герпеса I типа и цитомегаловируса (ЦМВ). TLR4 связывается с липополисахаридами и белками теплового шока *Chlamydia trachomatis*, липополисахаридами *Neisseria gonorrhoeae*, маннаном *Candida albicans* [24, 82]. Имеются данные об увеличении экспрессии TLR2 и TLR4 при угрожающем выкидыше и неразвивающейся беременности [20]. TLR3 способен распознавать мРНК вирусов, находящихся в половых путях женщины — вируса простого герпеса, вируса папилломы человека, вируса гепатитов В и С, цитомегаловируса, ВИЧ [63]. Выявлена способность TLR3 распознавать двухцепочечную РНК простейших, например, *Shistosoma mansoni*. TLR5 служит сенсором для бактерий, способных проникать через эпителий [50, 59]. Повышение экспрессии TLR5 в эндоцервиксе может быть ассоциировано с прогрессией рака шейки матки [23, 55]. TLR7 и TLR8 способны распознавать собственную и вирусную одноцепочечную РНК (например, ВИЧ). Агонист TLR7 имиквимод и агонист TLR8CL075 способны активизировать выработку ИЛ-8 в клетках шейки матки, эндометрия и маточных труб [45]. Лигандом TLR9 служит ДНК (неметилированные CpG-последовательности) бактерий и вирусов. Передача сигналов посредством TLR9 ведет к активации противовирусных иммунных реакций при генитальном герпесе и цитомегаловирусной инфекции [45, 47]. Исследования также свидетельствуют о повышенной экспрессии TLR9 в эпителиоцитах при раке шейки матки [23, 55]. Специфический лиганд для TLR10 не определен [92]. Экспрессия TLR1 и TLR2 в эпителии слизистой цервикального канала достоверно увеличивается при наличии урогенитальной инфекции, что приводит к активации синтеза антимикробных пептидов и провоспа-

лительных цитокинов [7]. Распознавание липопротеидов *Neisseria gonorrhoeae* происходит путем их связывания с TLR1 и TLR2 [39]. В распознавании хламидийной инфекции участвуют 3 типа TLRs: TLR2 (лиганд — пептидогликан), TLR4 (лиганды — липополисахарид и белки теплового шока) и TLR9 (лиганд — ДНК хламидий) [34]. Различия в экспрессии TLR2 могут влиять на степень выраженности воспалительного процесса при одинаковом количестве патогена [33]. Полиморфизм генов TLR9, TLR4, CD14 и NOD2 у пациенток с хламидийной инфекцией при наличии измененных пар нуклеотидных последовательностей двух и более из них увеличивает риск развития спаечного процесса маточных труб [35]. Поверхностные сложные углеводы липофосфогликанов *Trichomonas vaginalis* способны распознаваться TLRs с дозозависимым увеличением уровней хемокинов: интерлейкина-8 (IL-8) и макрофагального воспалительного протеина-3 α (MIP-3 α) [38]. Дендритные клетки являются антиген-презентирующими клетками, играющими значительную роль в заражении ВИЧ как путем прямого инфицирования, так и путем захвата вирусных частиц с последующей их презентацией Т-лимфоцитам в лимфоузлах. Высокий риск заражения ВИЧ среди пациентов с трихомониазом объясняется активацией системы врожденного иммунитета посредством связывания липофосфогликанов трихомонад с TLRs [62, 64]. Распознавание TLR3 эпителиальных клеток женских половых путей вирусной инфекцией сопровождается индукцией секреции IL-6, IL-8 и гранулоцитарного хемотаксического протеина-2 [69]. Обработка эмбриональных клеток эндцервикса, зараженных вирусом простого герпеса 2 типа, полицитидиловой кислотой (poly I:C) значительно снижает возможность передачи вирусов вследствие выработки цитокинов и интерферонов [63]. Стимуляция TLRs инициирует на первом этапе синтез неспецифических факторов защиты: дефензины, кателицидины и гистатины; семейство АМП — небольшие молекулы из аминокислот, действуют как эндогенные природные антибиотики, выполняют функцию киллинга микробов и, как сигнальные молекулы, вызывают активацию иммунных клеток; обладают активностью медиаторов, участвующих в процессе воспаления, и антигенов, индуцирующих активацию Т-клеток [11, 52]. Кателицидины (КЦ) (семейство АМП) обнаружены в пероксидаза-отрицательных гранулах нейтрофилов. Эти соединения синтезируются в виде препробелков. Человеческий катионный антимикробный белок (hCAP18, м.м. 18 kDa) — единственный идентифицированный человеческий КЦ. Помимо нейтрофилов, hCAP18 выявлен в лимфоцитах и моноцитах, в сквамозном эпителии (рта, языка, пищевода, шейки матки и вагины), эпителии легочной ткани, кератиноцитах при воспалительных заболеваниях и эпи-

дидимите. В высокой концентрации они способны разрушать микробные плазматические мембраны и оболочки, а в меньших концентрациях играют роль модуляторов врожденного иммунитета [65].

TLRs у беременных

Беременность сопровождается физиологическим иммунодефицитом. При этом снижаются уровни экспрессии на моноцитах рецепторов — индикаторов патогенов, что коррелирует с функциональной активностью этих клеток и сопровождается неадекватной реакцией на проникновение чужеродных агентов (микроорганизмов), первичным инфицированием или активацией хронической инфекции у беременных [4, 5].

Во время беременности под влиянием гормонов желтого тела слизистая влагалища утолщается, увеличивается эластичность клеток промежуточного слоя, в них возрастает синтез гликогена, создаются благоприятные условия для жизнедеятельности лактобацилл. По мере прогрессирования беременности снижается численность транзитных микроорганизмов и увеличивается количество лактобацилл. К моменту родов у здоровых беременных женщин снижается уровень микробного обсеменения родовых путей при максимальном доминировании ацидофильной флоры [9, 10]. При беременности повышаются уровни экспрессии генов TLR1, TLR2, TLR4 и дефензина HBD-1 (в эпителиальных клетках цервикального канала) и обеспечивается защита организма матери и плода от патогенных микроорганизмов на уровне слизистых оболочек. При неразвивающейся беременности происходит снижение экспрессии гена TLR2 клетками цервикального канала и уменьшение продукции HNP1–3 в плазме периферической крови [7, 8, 11, 15]. В период беременности отмечается экспрессия дефензина HBD1 клетками хориона и плаценты [28]. Плацента является высокоспециализированным барьером, защищающим плод от инфекции. Клетки трофобласта могут взаимодействовать с микроорганизмами в зоне имплантации и способны инициировать иммунный ответ. Трофобласт функционирует как активный компонент системы врожденного иммунитета. В ткани плаценты процесс апоптоза может быть активирован через TLR2 и TLR4. Клетки трофобласта экспрессируют TLR2 и TLR1, при этом уровень экспрессии TLR6 незначителен. Гиперэкспрессия TLR6 приводит к блокировке апоптоза и к выработке IL-6 и IL-8 клетками трофобласта. Клетки в зоне фетоплацентарного комплекса через TLRs распознают патогены, которые могут поставить под угрозу нормальное течение беременности. Гиперактивация механизмов врожденного иммунитета может привести к чрезмерному воспалительному процессу или к апоптозу

клеток плаценты. TLRs присутствуют в матке и плаценте во время беременности. В плаценте и в децидуальной ткани экспрессируются все 10 типов TLRs [25, 26, 27, 56, 59]. Наблюдается увеличение уровней TLR2 и TLR5 перед родами. Способность TLR4 реагировать на липополисахариды, выражающуюся в достоверно большем синтезе TNF α , наблюдалась в плацентарной ткани, полученной у пациенток, родивших самостоятельно, по сравнению с группой женщин после кесарева сечения [74]. По-видимому, этот факт может иметь значение в патогенезе послеродовых эндометритов, которые чаще встречаются после оперативных родов. Уровень экспрессии генов TLR2 и TLR4 в клетках плаценты превышает уровни экспрессии этих рецепторов в эпителиальных клетках цервикального канала. При этом уровень экспрессии гена TLR2 значительно превосходит TLR4 [13]. Развитие воспалительной реакции может происходить как на локальном, так и на системном уровнях. В слизистых репродуктивного тракта отмечается выраженная экспрессия факторов врожденного иммунитета. Отмечается постоянное взаимодействие факторов локальной защиты и условно-патогенной микробиоты влагалища [66, 89]. В зависимости от активации различных TLRs инфекционный агент может вызывать прямое или опосредованное воздействие на клетки трофобласта [31, 46, 87, 88]. Одним из ключевых составляющих иммунного ответа является моноцит, регулирующий лимфоцитарный ответ путем переработки антигенов и продукции цитокинов [84]. Клетки трофобласта могут продуцировать факторы, активирующие моноциты при беременности. Механизм фагоцитоза циркулирующими моноцитами в кровяном русле матери клеток трофобласта, фетальных эритроцитов и лейкоцитов, вызывает их активацию, способствуя становлению нормального течения беременности [6]. Иммунные клетки организма беременной активно рекрутируются внедряющимся трофобластом, экспрессирующим TLRs. Благодаря этим рецепторам, клетки трофобласта способны распознавать образцы бактерий, вирусов, паразитов и грибов. Клетки трофобласта отвечают на вирусный лиганд через систему TLR3 [57]. Установлено, что TLRs выступают в роли клеточных регуляторов на генетическом уровне. Децидуальная оболочка матки способна вырабатывать TLRs и их внутриклеточные сигнальные молекулы, модулируя иммунный ответ в период гестации [61]. При беременности развивается перевес Th2 лимфоцитов, частично за счет индукции синтеза IL-4 прогестероном. Клеточно-опосредованный иммунный ответ угнетен. Иммуносупрессия, как системная, так и локальная, реализуется за счет ряда гормонов и цитокинов (IL-4, IL-10 и TGF- β). В процессе беременности активность естественных киллерных клеток прогрессивно снижается и восста-

навливается на 6–10-е сутки после родов. Таким образом, изменения, возникающие при беременности в различных звеньях иммунной системы, являются одним из основных факторов реализации вирусной инфекции у беременных, а как следствие — приводят к развитию бактериальных осложнений, которые составляют немалую проблему из-за невозможности всесторонней диагностики и полноценного медикаментозного лечения в силу определенных противопоказаний [2]. В период беременности отмечается экспрессия дефензина HBD1 клетками хориона и плаценты [28]. TLR6 обладает протективным действием — предотвращает невынашивание беременности, переключая иммунный ответ с индукции апоптоза трофобласта на синтез провоспалительных цитокинов, что способствует элиминации патогенных микроорганизмов [25]. Аллергические заболевания не влияют на течение беременности, а беременность не оказывает воздействия на аллергический процесс; у многих пациенток на фоне гестации наступает ремиссия аллергического заболевания. Однако у беременных возможно и обострение аллергического заболевания. Доказано, что наличие аллергического заболевания не является противопоказанием для беременности и рождения ребенка [3].

TLRs при внутриутробной инфекции

Внутриутробная инфекция (ВУИ) новорожденного проявляется в течение первых 3 суток раннего неонатального периода и сопровождается гепатоспленомегалией, неврологическими нарушениями, дыхательными расстройствами, сердечно-сосудистой недостаточностью. Типичным проявлением ВУИ является невынашивание беременности. На сроках от 14 до 16 недель происходит самопроизвольный аборт или гибель эмбриона [81]. Более чем в половине случаев наблюдений самопроизвольное прерывание беременности и преждевременные роды в ранние сроки начинаются с преждевременного разрыва плодных оболочек и в редких случаях — с повышения сократительной активности матки [43]. Внутриутробная инфекция и инфицирование различаются.

При внутриутробной инфекции происходит заражение плода путем проникновения патогена от инфицированной матери. ВУИ выражается целым рядом клинических проявлений в организме плода и новорожденного вплоть до генерализации инфекции и реализации сепсиса, тогда как при внутриутробном инфицировании возбудитель, проникая в плод, не вызывает клинических проявлений в его организме [76]. На частоту ВУИ оказывают влияния вид возбудителя, срок гестации на момент родоразрешения, патологическое течение родов. Встреча плода и новорожденного с инфектом и дальнейшая реализация заболевания может происходить

в анте- и интранатальном периодах. При ВУИ, как при любом инфекционном процессе, происходит взаимодействие микро- и макроорганизма, включающего в себя не только иммунокомпетентные клетки хозяина, продукты их деятельности и барьер слизистой, но и слой условно-патогенной микрофлоры. В тканях маточно-плацентарного комплекса человека происходят сложные процессы, обусловленные продукцией большого количества цитокинов клетками лейкоцитарного и нелеукоцитарного происхождения [6]. Дисбаланс компонентов врожденного иммунитета: нарушение экспрессии HBD1 (дефензин) и TLR в эпителиальных клетках нижних отделов мочеполового тракта и в клетках плаценты является маркером реализации ВУИ [7, 80]. Изменение иммунной системы в период гестации может быть обусловлено повышенным риском инфицирования. Многие латентные инфекции могут активироваться во время беременности [41, 42].

Условием для развития инфекционного процесса является восприимчивость плода, которая определяется эффективностью иммунной защиты. Повреждение макроорганизма может развиваться вследствие либо микробных факторов, либо ответа плода (воспаления), либо их сочетания. В одних случаях ключевые звенья патогенеза связаны преимущественно с гиперергическим иммунным ответом, ведущим к развитию избыточной воспалительной реакции, в других вариантах — с недостаточностью протективных реакций [51]. Установлена необходимость Th2-окружения в период имплантации и дальнейшего успешного вынашивания беременности. Тогда как Th1-цитокины связаны с бесплодием и привычной потерей беременности. Также установлен факт необходимого присутствия Th-ответа в полноценной иммунологической реакции на внедрение острой инфекции. Нарушения в системе Th-ответа, обусловленные поломкой локального регулирования активности цитокинов, могут быть причиной привычных репродуктивных потерь у женщин [83].

Инфекция является одним из основных факторов, оказывающих влияние на изменение экспрессии TLRs во внутриутробном и постнатальном периодах развития. ВУИ представляет собой проникновение микроорганизмов в ткани плода и его заражение. Уровень экспрессии TLRs прямо коррелирует с тяжестью процесса, что позволяет рассматривать их как ранние маркеры инфекции. В зависимости от природы патогена наблюдается усиление экспрессии того или иного TLRs. К примеру, у новорожденных, инфицированных грамположительными бактериями, увеличивается экспрессия TLR2, а экспрессия TLR4 возрастает у детей, инфицированных грамотрицательными бактериями и RSV [40, 93]. Вирусная инфекция индуцирует экспрессию TLR1, TLR2, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 и запу-

скает продукцию IFN 1-го типа [90]. При сепсисе у новорожденных существенное и быстрое увеличение экспрессии TLR2 на моноцитах прослеживается уже при первоначальных признаках воспаления и остается неизменно высокой в остром периоде. Напротив, на гранулоцитах TLR2 появляются лишь на короткий промежуток времени. Уменьшение уровня экспрессии TLR2 указывает на успешность терапии [85]. В группе пациенток с УГИ, родивших детей с признаками внутриутробной инфекции, отмечается гиперэкспрессия гена TLR2 (клетками эпителия цервикального канала в 30 раз, клетками плаценты в 7 раз) по сравнению со здоровыми беременными. Дисбаланс компонентов врожденного иммунитета: снижение экспрессии HBD1 и гиперэкспрессия TLR2 и в эпителиальных клетках, и в клетках плаценты является маркерами развития осложнений беременности: преждевременных родов инфекционного генеза и реализации ВУИ [7]. Доказана роль белка теплового шока HsP70 в развитии эндометриоза, что связано с активацией TLR4 и последующей продукцией цитокинов и факторов роста опухолей. Блокада TLR4 с помощью моноклональных антител значительно снижает продукцию цитокинов, что открывает возможность разработки новых лекарственных средств для лечения эндометриоза [53, 54].

Наибольший риск развития внутриутробного инфицирования отмечается при первичных вирусных инфекциях, сопровождающихся выраженными изменениями иммунного статуса (дефицит субпопуляций зрелых лимфоцитов, Т-хелперов, естественных киллеров); перинатальная смертность от сепсиса может быть связана с первичным вирусным инфицированием. При непрерывно персистирующих вирусных инфекциях риск поражения плода в 10 раз ниже, чем при первичных. Инфекция реализуется при длительной репликации вируса в крови на фоне иммуноинтерферонодефицитных состояний. Персистирующая вирусная инфекция способствует возникновению неспецифического внутриутробного инфицирования бактериальной флорой. Первичное заражение будущей матери, например, вирусом простого герпеса 2 типа, ЦМВ или реактивация латентного вируса во время беременности, может привести к внутриутробному инфицированию плода, невынашиванию, возникновению генерализованной инфекции у новорожденного, гибели плода и др. [2, 10].

ВУИ определяются видом возбудителя, его вирулентностью, путями проникновения микроорганизмов от матери к плоду, тропизмом возбудителя к плаценте, органам и тканям плода. Большое значение имеет сходство между антигенами микро- и макроорганизмов, снижающее биологическую чужеродность инфекта для организма хозяина и реакцию его иммунной

системы на присутствие антигена возбудителя. Доказан тропизм возбудителей к определенным эмбриональным тканям, являющимся идеальной средой для размножения вирусов и микробов [14, 19]. В результате внутриутробного инфицирования через плаценту или из низлежащих отделов женского репродуктивного тракта патогены могут проникать в матку. Внутриутробное инфицирование приводит к таким патологиям беременности, как задержка внутриутробного развития плода, гестоз и др. В дополнение к основному сигнальному пути с TLRs, который приводит к выработке цитокинов и к развитию воспалительных реакций, активация TLRs может также приводить к запуску процессов апоптоза. Особенности течения инфекционного процесса в период гестации влияют на выраженность функциональных и/или структурных изменений в системе фетоплацентарного комплекса (острый процесс или период обострения, стадия ремиссии). Наиболее неблагоприятными являются острый инфекционный процесс и обострение хронического [10, 22].

Хориоамнионит: клинические проявления инфекции и гистологические изменения в плаценте

Несмотря на выраженные патоморфологические изменения, развивающиеся при данной патологии, симптоматически этот процесс, как правило, не имеет специфических проявлений, вследствие чего гистологически хориоамнионит верифицируется чаще, чем клинически [12]. Нераспознанный хориоамнионит может являться причиной преждевременных родов неустановленной этиологии в 30% случаев [1].

Снижение экспрессии некоторых TLRs, а также белков их сигнального пути играет важную роль в развитии инфекционно-воспалительных осложнений. Описана роль TLRs в патогенезе самопроизвольных выкидышей ранних сроков. Так, *in vitro* было установлено, что активация TLR5 в клетках эндометрия препятствует адгезии трофобласта [77]. К такому же эффекту приводит стимуляция белка сигнального пути TLR NF- κ B [29]. Активация гетеродимеров TLR1/TLR2 или TLR2/TLR6 приводит к индукции воспалительного ответа, что является причиной невынашивания беременности [24].

Повреждения белого вещества головного мозга, часто встречающиеся при преждевременных родах, могут быть связаны с активацией TLR4 у плода. Низкие дозы липополисахаридов, не вызывающие тяжелых осложнений беременности, способны значительно усиливать повреждения головного мозга плода гипоксического генеза [44]. Степень тяжести повреждений головного мозга у новорожденных зависит не только

от факта преждевременных родов, но и от наличия инфекции. Активация TLR3 вирусами или полицитидиловой кислотой (poly I:C) способствует не только прерыванию беременности, но также развитию шизофрении и аутизма [75, 79]. Белок HMGB1, являющийся лигандом TLR4, в больших количествах экспрессируется в децидуальной оболочке у женщин с поздним гестозом, что может свидетельствовать о его роли в возникновении данной патологии [49]. В реализации ВУИ первостепенную роль играет снижение способности иммунной системы беременной к своевременному распознаванию и уничтожению внедряющегося инфекционного агента. Иммунологическая защита проявляется в слаженной работе врожденной и приобретенной систем иммунитета [6, 78].

Реализация инфекционного процесса в плоде происходит благодаря нарушению в работе клеточных и тканевых плацентарных барьеров. Реализация воспалительного ответа в фетоплацентарном комплексе происходит в результате целого каскада реакций, таких как активация макрофагов и клеток эндотелия, запуск фактора Виллебранда, массивная выработка провоспалительных цитокинов и лимфоцитов III типа на локальном уровне [32]. В результате триггерного действия провоспалительных медиаторов происходит вторичная гиперстимуляция макрофагов, сопровождающаяся системным эндотелиозом, появлением белков острой фазы воспаления и молекул клеточной адгезии. В финале воспаления происходит нарушение микроциркуляции с последующим разворачиванием ДВС-синдрома (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания). В результате возникновения в период гестации уникального состояния между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета беременной моноцит становится ключевой клеткой иммунологической адаптации, управляя запуском Th1 или Th2 путей специфического иммунного ответа. Молекулярно-генетическими предикторами реализации внутриутробной инфекции у новорожденных является наличие у матерей полиморфизма генов IL1B и IL8. Активация факторов врожденного иммунитета в ответ на локальные дисбиотические нарушения является одним из защитных механизмов против инфицирования плода. Нарушение в системе регуляции локальной воспалительной реакции способствует реализации ВУИ [10, 14, 16, 21, 30].

Таким образом, в представленном систематическом обзоре литературы обосновывается значимость TLRs гениталий женщин как необходимого и определяющего фактора в реакции на различные изменения в окружающей среде (как внешней, так и внутренней, как относительно организма, так и относительно отдельных клеток), а также в ответе за изменения в метаболизме, структурном или энергетическом, в под-

держании антиинфекционной резистентности и гомеостаза. При физиологически развивающейся, неосложненной беременности на фоне иммунодепрессии в ответ на беременность TLRs при контакте с инфекционными и неинфекционными патогенами стимулируют выработку неспецифических факторов адаптивного иммунитета (дефензины, кателицидины и гистатины и др.), которые совместно с врожденными неспецифическими факторами (лизоцимом, комплементом, пропердином и др.) поддерживают антиинфекционную резистентность гениталий женщин на высоком уровне. При внутриутробной инфекции беременных установлена значи-

мость опосредованного TLRs влияния инфекционного и неинфекционного факторов на гомеостаз организма, на формирование нарушений в антиинфекционной резистентности на организменном и местном уровнях с выявлением новых патофизиологических и иммунологических патогенетических механизмов развития патологических процессов. Объективизируются объяснения отсутствия симптоматики, возможность атипичных проявлений, бессимптомного течения инфекции. Открываются новые возможности совершенствования и повышения информативности и персонализации методов диагностики, лечения и профилактики.

Список литературы/References

1. Абрамченко В.В. Классическое акушерство. Книга вторая. СПб.: Нордмедиздат, 2008. 879 с. [Abramchenko V.V. Klassicheskoe akusherstvo. Kniga vtoraya. [Classical obstetrics. The second book]. St. Petersburg: Nordmedizdat, 2008. 879 p.]
2. Алешкин В.А., Ложкина А.Н., Загородняя Э.Д. Иммунология репродукции: пособие для врачей, ординаторов и научных работников. Чита: 2004. 79 с. [Aleshkin V.A., Lozhkina A.N., Zagorodnyaya E.D. Immunologiya reproduksii: posobie dlya vrachei, ordinatov i nauchnykh rabotnikov. [Immunology of reproduction: a manual for physicians, residents and researchers]. Chita, 2004. 79 p.]
3. Аллергология. Федеральные клинические рекомендации. Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: Фармарус Принт Медиа, 2014. 126 с. [Allergologiya. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii. Pod red. R.M. Khaitov, N.I. Ilyinoi. [Allergology. Federal clinical recommendations. Eds. Khaitov R.M., Ilyina N.I.]. Moscow: Farmarus Print Media, 2014. 126 p.]
4. Бочарова И.И., Новикова С.В., Дмитриева Е.В., Паршина О.В., Гусева Т.С. Интерферонотерапия при урогенитальных инфекциях // Вестник «Ферона». 2013. № 1. С. 13–16. [Bocharova I.I., Novikova S.V., Dmitrieva E.V., Parshina O.V., Guseva T.S. Interferon therapy in urogenital infections. Vestnik «Feron» = Bulletin «Feron», 2013, no. 1, pp. 13–16. (In Russ.)]
5. Буданов П.В., Стрижаков А.Н. Этиология, патогенез, диагностика и лечение внутриутробной инфекции // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2010. Т. 9, № 3. С. 61–71. [Budanov P.V., Strizhakov A.N. Etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment of intrauterine infection. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii = Problems of Gynecology, Obstetrics and Perinatology, 2010, vol. 9, no. 3, pp. 61–71. (In Russ.)]
6. Ванько Л.В., Сафронова В.Г., Матвеева Н.К., Сухих Г.Т. Оксидативный стресс в генезе акушерских осложнений. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 264 с. [Van'ko L.V., Safronova V.G., Matveeva N.K., Sukhikh G.T. Oksidativnyi stress v geneze akusherskikh oslozhenii. [Oxidative stress in the genesis of obstetric complications]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 264 p.]
7. Ганковская О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Лавров В.Ф., Романовская В.В., Карташов Д.Д., Фензелева В.А. Роль Toll-подобных рецепторов и дефензинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2008. № 1. С. 46–50. [Gankovskaya O.A., Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Lavrov V.F., Romanovskaya V.V., Kartashov D.D., Fenzeleva V.A. The role of toll-like receptors and defensins in the antimicrobial protection of female urogenital tract. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2008, no. 1, pp. 46–50. (In Russ.)]
8. Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Макаров О.В., Ганковская О.А., Акимова Е.А. Роль экспрессии генов Toll-подобного рецептора 2, каспаз и их ингибиторов в ткани плаценты в норме и при преждевременных родах инфекционного генеза // Российский иммунологический журнал. 2010. Т. 4, № 1 (13). С. 48–53. [Gankovskaya L.V., Kovalchuk L.V., Makarov O.V., Gankovskaya O.A., Akimova E.A. The role of gene expression of Toll-like receptor 2, caspases and their inhibitors in placental tissue in normal and premature birth with infectious genesis. Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2010, vol. 4, no. 1 (13), pp. 48–53. (In Russ.)]
9. Джобавя Э.М., Степанян А.В., Артизанова Д.П., Бояр Е.А., Хейдар Л.Х., Доброхотова Ю.Э. Современное обоснование к возможности терапии вагинальных дисбиозов во время беременности // Гинекология. 2009. Т. 11, № 1. С. 79–82. [Dzhobava E.M., Stepanyan A.V., Artisanova D.P., Boyar E.A., Heidar L.H., Dobrokhotova Y.E. Modern justification for the possibility of treatment of vaginal dysbiosis during pregnancy. Ginekologiya = Gynaecology, 2009, vol. 11, no. 1, pp. 79–82. (In Russ.)]
10. Инфекции в акушерстве и гинекологии. Под ред. Макарова О.В., Алешкина В.А., Савченко Т.Н. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 464 с. [Infektsii v akusherstve i ginekologii. Pod red. Makarova O.V., Aleshkina V.A., Savchenko T.N. [Infections in obstetrics and gynecology. Eds. Makarova O.V., Aleshkin V.A., Savchenko T.N.]. Moscow: MEDpress-inform, 2009. 464 p.]
11. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 639 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Y. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya s osnovami obshchei immunologii. [Clinical immunology and allergology: with the basics of common immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 639 p.]
12. Крыжановская М.В. Роль инфекционного фактора в развитии преждевременных родов // Медико-социальные проблемы семьи. 2011. Т. 16, № 1. С. 104–107. [Kryzhanovskaya M.V. Role of the infectious factor in the development of premature birth. Mediko-sotsial'ni problemi sim'i = Medical-Social Problems of the Family, 2011, vol. 16, no. 1, pp. 104–107. (In Russ.)]
13. Макаров О.В., Бахарева И.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Романовская В.В., Ганковская О.А. Toll-подобные рецепторы как маркеры осложнений беременности // Аллергология и иммунология. 2007. Т. 8, № 3. С. 236. [Makarov O.V., Bakhareva I.V., Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Romanovskaya V.V., Gankovskaya O.A. Toll-like receptors as markers of pregnancy complications. Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology, 2007, vol. 8, no. 3, pp. 236. (In Russ.)]

14. Макаров О.В., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Ганковская О.А. Невынашивание беременности, инфекция, врожденный иммунитет. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 176 с. [Makarov O.V., Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Bakhareva I.V., Gankovskaya O.A. Nevynashivanie beremennosti, infektsiya, vrozhdennyi immunitet. [Miscarriage, infection, innate immunity]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 176 c.]
15. Макаров О.В., Ганковская Л.В., Ковальчук Л.В., Бахарева И.В., Романовская В.В., Ганковская О.А. Прогностическое значение компонентов врожденного иммунитета у беременных с высоким риском реализации внутриутробной инфекции // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2009. № 4. С. 27–33. [Makarov O.V., Gankovskaya L.V., Kovalchuk L.V., Bakhareva I.V., Romanovskaya V.V., Gankovskaya O.A. Prognostic value of components of innate immunity in pregnant women with a high risk of delivering intrauterine infection. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* = *Bulletin of Russian State Medical University*, 2009, no. 4, pp. 27–33. (In Russ.)]
16. Макасария А.Д., Бицадзе В.О., Акиншина С.В. Синдром системного воспалительного ответа в акушерстве. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 442 с. [Makatsariya A.D., Bitsadze V.O., Akinshina S.V. Sindrom sistemnogo vospalitel'nogo otveta v akusherstve. [The systemic inflammatory response syndrome in obstetrics]. Moscow: Medical information Agency, 2006. 442 p.]
17. Микробиоценозы и здоровье человека. Под ред. Алешкина В.А., Афанасьева С.С., Караулова А.В. М.: Издательство «Династия», 2015. 548 с. [Mikrobiotsenozy i zdorov'e cheloveka. Pod red. Aleshkina V.A., Afanas'eva S.S., Karaulova A.V. [Microbiocenoses and human health. Eds. Aleshkin V.A., Afanasiev S.S., Karaulov A.V.]. Moscow: The Publishing House «Dynasty»; 2015. 548 p.]
18. Новое в физиологии мукозального иммунитета. Под ред. Караулова А.В., Алешкина В.А., Афанасьева С.С., Несвижского Ю.В. М.: Издательство Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, 2015. 168 с. [Novoe v fiziologii mukoza'nogo immuniteta. Pod red. Karaulova A.V., Aleshkina V.A., Afanas'eva S.S., Nesvizhskogo Yu.V. [New in the physiology of the mucosal immune system. Eds. Karaulov A.V., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S., Nesvizhskiy Yu.V.]. Moscow: Publishing House of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 2015. 168 p.]
19. Рюмина И.И., Зубков В.В., Евтеева Н.В. Профилактика, диагностика и лечение омфалита у новорожденных // Акушерство и гинекология. 2012. № 5. С. 68–74. [Ryumina I.I., Zubkov V.V., Evteeva N.V. Prevention, diagnosis and treatment of omphalitis in newborns. *Akusherstvo i ginekologiya* = *Obstetrics and Gynecology*, 2012, no. 5, pp. 68–74. (In Russ.)]
20. Селихова М.С., Кузнецова О.А., Вдовин С.В., Дмитриенко Г.В. Роль эндотоксемии и механизмов врожденного иммунитета в патогенезе неразвивающейся беременности // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2012. № 1. С. 18–20. [Selikhova M.S., Kuznetsova O.A., Vdovin S.V., Dmitrienko G.V. The role of endotoxemia and mechanisms of innate immunity in the pathogenesis of non-developing pregnancy. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* = *Bulletin of Volgograd State Medical University*, 2012, no. 1, pp. 18–20. (In Russ.)]
21. Серебренникова С.Н., Семинский И.Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе (сообщение 2) // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2008. Т. 83, № 8. С. 5–8. [Serebrennikova S.N., Seminsky I.Z. The role of cytokines in the inflammatory process (message 2). *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk)* = *Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2008, vol. 83, no. 8, pp. 5–8. (In Russ.)]
22. Тирская Ю.И., Белкова Т.Н., Рудакова Е.Б., Долгих Т.И., Шакина И.А. Врачебная тактика при внутриутробных инфекциях // Акушерство и гинекология. 2011. № 8. С. 42–47. [Tirskaya Y.I., Belkova T.N., Rudakova E.B., Dolgikh T.I., Shakina I.A. Medical tactics for the intrauterine infections. *Akusherstvo i ginekologiya* = *Obstetrics and Gynecology*, 2011, no. 8, pp. 42–47. (In Russ.)]
23. Шебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии // Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2010. Т. 2, № 3 (6). С. 28–37. [Sheblyakov D.V., Logunov D.Y., Tukhvatulin A.I., Shmarov M.M., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Toll-like receptors (TLR) and their role in tumor progression. *Acta Naturae (Russian version)*, 2010, vol. 2, no. 3 (6), pp. 28–37. (In Russ.)]
24. Aboussahoud W., Bruce C., Elliott S., Fazeli A. Activation of Toll-like receptor 5 decreases the attachment of human trophoblast cells to endometrial cells in vitro. *Hum. Reprod.*, 2010, vol. 25, no. 9, pp. 2217–2228. doi: 10.1093/humrep/deq185
25. Abrahams V.M., Aldo P.B., Murphy S.P., Visintin I., Koga K., Wilson G., Romero R., Sharma S., Mor G. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 9, pp. 6035–6043. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6035
26. Abrahams V.M., Bole Aldo P., Kim Y.M., Straszewski-Chavez S.L., Chaiworapongsa T., Romero R., Mor G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J. Immunol.*, 2004, vol. 173, no. 7, pp. 4286–4296. doi: 10.4049/jimmunol.173.7.4286
27. Abrahams V.M., Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta*, 2005, vol. 26, no. 7, pp. 540–547. doi: 10.1016/j.placenta.2004.08.010
28. Boldenow E., Jones S., Lieberman R.W., Chames M.C., Aronoff D.M., Xi C., Loch-Carus R. Antimicrobial peptide response to group B Streptococcus in human extraplacental membranes in culture. *Placenta*, 2013, vol. 34, no. 6, pp. 480–485. doi: 10.1016/j.placenta.2013.02.010
29. Caballero I., Al Ghareeb S., Basatvat S., Sanchez-Lopez J.A., Montazeri M., Maslehat N., Elliott S., Chapman N.R., Fazeli A. Human trophoblast cells modulate endometrial cells nuclear factor kB response to flagellin in vitro. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 1: e39441. doi: 10.1371/journal.pone.0039441
30. Canavan T.P., Simhan H.N. Innate immune function of the human decidual cell at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.*, 2007, vol. 74, no. 1–2, pp. 46–52. doi: 10.1016/j.jri.2006.10.004
31. Chen Y.P., Pfab T., Slowinski T., Richter C.M., Godes M., Hocher B. Impact of genetic variation of tumor necrosis factor-alpha on gestational hypertension. *Clin. Med. J. (Engl.)*, 2006, vol. 119, no. 9, pp. 719–724.
32. Crocker I.P., Baker P.N., Fletcher J. Neutrophil function in pregnancy and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000, vol. 59, no. 7, pp. 555–564.
33. Darville T., O'Neill J.M., Andrews C.W. Jr., Nagarajan U.M., Stahl L., Ojcius D.M. Toll-like receptor-2, but not toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, no. 11, pp. 6187–6197. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6187

34. Den Hartog J.E., Morre S.A., Land J.A. Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: immunogenetic aspects and serological screening. *Hum. Reprod. Update*, 2006, vol. 12, no. 6, pp. 719–730. doi: 10.1093/humupd/dml030
35. Den Hartog J.E., Ouburg S., Land J.A., Lyons J.M., Ito J.I., Pena A.S., Morre S.A. Do host genetic traits in the bacterial sensing system play a role in the development of Chlamydia trachomatis-associated tubal pathology in subfertile women? *BMC Infect. Dis.*, 2006, vol. 6, no. 1, pp. 122. doi: 10.1186/1471-2334-6-122
36. Dusio G.F., Cardani D., Zanobbio L., Mantovani M., Luchini P., Battini L., Galli V., Diana A., Balsari A., Rumio C. Stimulation of TLRs by LMW-HA induces self-defense mechanisms in vaginal epithelium. *Immunol. Cell. Biol.*, 2010, vol. 89, no. 5, pp. 630–639. doi: 10.1038/icb.2010.140
37. Fahey J.V., Schaefer T.M., Wira C.R. Sex hormones modulation of human uterine epithelial cells immune response. *Integr. Comp. Biol.*, 2006, vol. 46, no 6, pp. 1082–1087. doi: 10.1093/icb/icl036
38. Fichorova R.N., Tifonova R.T., Gilbert R.O., Costello C.E., Hayes G.R., Lucas J.J., Singh B.N. Trichomonas vaginalis lipophoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no. 10, pp. 5773–5779. doi: 10.1128/iai.00631-06
39. Fisette P.L., Ram S., Andersen J.M., Guo W., Ingalls R.R. The Lip lipoprotein from Neisseria gonorrhoeae stimulates cytokine release and NF- κ B activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2 dependent manner. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 47, pp. 46252–46260. doi: 10.1074/jbc.m306587200
40. Gargo A., Tominac M., Krsulovic-Hresic V., Bace A., Matic M., Drazenovic V., Mlinaric-Galinovic G., Kosor E., Gotovac K., Bolanca I., Batinic S., Rabatic S. Increased Toll-like receptors 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J. Clin. Exp. Immunol.*, 2004, vol. 135, no. 2, pp. 267–272. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02364.x
41. Gomez-Lopez N., Guilbert L.J., Olson D.M. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, vol. 88, no. 4, pp. 625–633. doi: 10.1189/jlb.1209796
42. Gomez-Lopez N., Tanaka S., Zaeem Z., Metz G.A., Olson D.M. Maternal circulating leukocytes display early chemotactic responsiveness during late gestation. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2013, vol. 13, no. 1, pp. S8. doi:10.1186/1471-2393-13-S1-S8
43. Grigsby P.L., Novy M.J., Adams Waldorf K.M., Sadowsky D.W., Gravett M.G. Choriodecidual inflammation: a harbinger of the preterm labor syndrome. *Reprod. Sci.*, 2010, vol. 17, no. 1, pp. 85–94. doi: 10.1177/1933719109348025
44. Hagberg H., Peebles D., Mallard C. Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxicischemic, and excitotoxic insults. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2002, vol. 8, no. 1, pp. 30–38. doi: 10.1002/mrdd.10007
45. Hart O.M., Athie-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. TLR7/8 mediated activation of human NK-cells results in accessory cell-dependent IFN- γ production. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 3, pp. 1636–1642. doi: 10.4049/jimmunol.175.3.1636
46. Helminen M., Nuolivirta K., Virta M., Halkosalo A., Korppi M., Vesikari T., Hurme M. IL-10 gene polymorphism at –1082 A/G is associated with severe rhinovirus bronchiolitis in infants. *Pediatr. Pulmonol.*, 2008, vol. 43, no. 4, pp. 391–395. doi: 10.1002/ppul.20793
47. Hemmi H.A., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 2000, vol. 408, no. 6813, pp. 740–745. doi: 10.1038/35047123
48. Hickey D.K., Fahey J.V., Wira C.R. Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, α - β -defensins and TLRs. *Innate Immunity*, 2013, vol. 19, no. 2, pp. 121–131. doi: 10.1177/1753425912454026
49. Holmlund U., Wahamaa H., Bachmayer N., Bremme K., Sverremark-Ekstrom E., Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1 (HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunology*, 2007, vol. 122, no. 3, pp. 430–437. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02662.x
50. Jarchum I., Liu M., Lipuma L., Pamer E.G. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute Clostridium difficile colitis. *Infect. Immun.* 2011, vol. 79, no. 4, pp. 1498–1503. doi: 10.1128/iai.01196-10
51. Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5th ed. New York: Garland Publishing, 2001. 884 p.
52. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, vol. 34, no. 5, pp. 637–650. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
53. Khan K.N., Kitajima N., Imamura T., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70. *Hum. Reprod.*, 2008, vol. 23, no. 10, pp. 2210–2219. doi: 10.1093/humrep/den195
54. Khan K.N., Kitajima M., Hiraki K., Fujishita A., Sekine I., Ishimaru T., Masuzaki H. Toll-like receptors receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and Toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 2009, vol. 68, no. 1, pp. 40–52. doi: 10.1159/000212061
55. Kim W.Y., Lee J.W., Choi J.-J., Choi C.H., Kim T.-J., Kim B.-J., Song S.Y., Bae D.-S. Increased expression of Toll-like receptor 5 during progression of cervical neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2008, vol. 18, no. 2, pp. 300–305. doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.01008.x
56. Koga K., Aldo P.B., Mor G. Toll-like receptors and pregnancy: trophoblast as modulators of the immune response. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 191–202. doi: 10.1111/j.1447-0756.2008.00963.x
57. Koga K., Cardenas I., Aldo P., Abrahams V.M., Peng B., Fill S., Romero R., Mor G. Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2009, vol. 61, no. 3, pp. 196–212. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00682.x
58. Koga K., Izumi G., Mor G., Fujii T., Osuga Y. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, vol. 72, no. 2, pp. 192–205. doi: 10.1111/aji.12258
59. Koga K., Mor G. Toll-like R at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, vol. 63, no. 6, pp. 587–600. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00848.x
60. Kramer B.W., Ikegami M., Moss T.J., Nitsos I., Newnham J.P., Jobe A.H. Endotoxin-induced chorioamnionitis modulates innate immunity of monocytes in preterm sheep. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2005, vol. 171, no. 1, pp. 73–77. doi: 10.1164/rccm.200406-745oc
61. Krikun G., Lockwood C.J., Abrahams V.M., Mor G., Pidas M., Guller S. Expression of Toll-like receptors in the human decidua. *Histol. Histopathol.*, 2007, vol. 22, no. 8, pp. 847–854. doi: 10.14670/HH-22.847
62. Lekkerkerker A.N., van Kooyk Y., Geijtenbeek T.B. Viral piracy: HIV-1 targets dendritic cells for transmission. *Curr. HIV Res.*, 2006, vol. 4, no. 2, pp. 169–176. doi: 10.2174/157016206776055020

63. MacDonald E.M., Savoy A., Gillgrass A., Fernandez S., Smieja M., Rosenthal K.L., Ashkar A.A., Kaushic C. Susceptibility of human female primary genital epithelial cells to herpes simplex virus, type-2 and the effect of TLR3 ligand and sex hormones on infection. *Biol. Reprod.*, 2007, vol. 77, no. 6, pp. 1049–1059. doi: 10.1095/biolreprod.107.063933
64. Magnus M., Clark R., Myers L., Farley T., Kissinger P.J. Trichomonas vaginalis among HIV-infected women: are immune status or protease inhibitor use associated with subsequent T. vaginalis positivity? *Sex. Transm. Dis.*, 2003, vol. 30, no. 11, pp. 839–843. doi: 10.1097/01.olq.0000086609.95617.8d
65. Mangoni M.L. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, vol. 68, no. 13, pp. 2157–2159. doi: 10.1007/s00018-011-0709-3
66. Mitchell C., Gottsch M.L., Liu C., Fredricks D.N., Nelson D.B. Associations between vaginal bacteria and levels of vaginal defensins in pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2013, vol. 208, no. 2, pp. 132.e1–132.e7. doi: 10.1016/j.ajog.2012.11.019
67. Monif G.R., Martens M.G. A guest editorial: antibiotic selection in obstetrics and gynecology. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 2002, vol. 57, no. 8, pp. 479–480. doi: 10.1097/01.OGX.0000024258.34252.68
68. Muthukuru M., Jotwani R., Cutler C.W. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 2, pp. 687–694. doi: 10.1128/iai.73.2.687-694.2005
69. Nasu K., Itoh H., Yuge A., Nishida M., Narahara H. Human oviductal epithelial cells express Toll-like receptor 3 and respond to double-stranded RNA: Fallopian tube-specific mucosal immunity against viral infection. *Hum. Reprod.*, 2006, vol. 22, no. 2, pp. 356–361. doi: 10.1093/humrep/del385
70. Netea M.G., Gow N.A., Munro CA, Bates S., Collins C., Ferwerda G., Hobson R.P., Bertram G., Hughes H.B., Jansen T., Jacobs L., Buurman E.T., Gijzen K., Williams D.L., Torensma R., McKinnon A., MacCallum D.M., Odds F.C., Van der Meer J.W., Brown A.J., Kullberg B.J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 6, pp. 1642–1650. doi: 10.1172/jci27114
71. Ochiel D.O., Fahey J.V., Ghosh M., Haddad S.N., Wira C. Innate immunity in the female reproductive tract: role of sex hormones in regulating uterine epithelial cell protection against pathogens. *Curr. Womens Health. Rev.*, 2008, vol. 4, no. 2, pp. 102–117. doi: 10.2174/157340408784246395
72. Orihara K., Nagata K., Hamasaki S., Oba R., Hirai H., Ishida S., Kataoka T., Oketani N., Ogawa M., Mizoguchi E., Ichiki H., Tei C. Time-course of Toll-like receptor 2 expression, as a predictor of recurrence in patients with bacterial infectious diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, vol. 148, no. 2, pp. 260–270. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03352.x
73. Patel M.V., Ghosh M., Fahey J.V., Wira C.R. Uterine epithelial cells specifically induce interferon-stimulated genes in response to polyinosinic-polycytidylic acid independently of estradiol. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4, pp. e35654. doi: 10.1371/journal.pone.0035654
74. Patni S., Wynen L.P., Seager A.L., Morgan G., White J.O., Thornton C.A. Expression and activity of Toll-like receptors 1–9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol. Reprod.*, 2009, vol. 80, no. 2, pp. 243–248. doi: 10.1095/biolreprod.108.069252
75. Patterson P.H. Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science*, 2007, vol. 318, no. 5850, pp. 576–577. doi: 10.1126/science.1150196
76. Sampedro M., Aliaga M., Mazuelas T., Rodriguez-Grander J. Diagnosis of congenital infection. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.*, 2011, vol. 29, no. 5, pp. 15–20. doi: 10.1016/S0213-005X(11)70039-8
77. Sanchez-Lopez J.A., Caballero I., Montazeri M., Maslehat N., Elliott S., Fernandez-Gonzalez R., Calle A., Gutierrez-Adan A., Fazeli A. Local activation of uterine Toll-like receptor 2 and 2/6 decreases embryo implantation and affects uterine receptivity in mice. *Biol. Reprod.*, 2014, vol. 90, no. 4, p. 87. doi: 10.1095/biolreprod.113.115253
78. Saphronova V.G., Sukhikh T., Van'ko L.V. Modern concept on the role of phagocytes in the pathogenesis of complications during pregnancy. *Bull. Experim. Biol. Med.*, 2002, vol. 134, no. 2, pp. 107–116. doi: 10.1023/A:1021117826014
79. Shi L., Fatemi S.H., Sidwell R.W., Patterson P.H. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J. Neurosci.*, 2003, vol. 23, no. 1, pp. 297–302.
80. Sonoda Y., Abdel Mageed A.M., Isobe N., Yoshimura Y. Induction of avian β -defensins by CpG oligodeoxynucleotides and pro-inflammatory cytokines in hen vaginal cells in vitro. *Reproduction*, 2013, vol. 145, no. 6, pp. 621–631. doi: 10.1530/rep-12-0518
81. Suzuki Y., Yamamoto T., Kojima K., Tanemura M., Tateyama H., Suzumori K. Evaluation levels of cytokines in amniotic fluid of women with intrauterine infection in the early second trimester. *Fetal. Diagn. Ther.*, 2005, vol. 21, no. 1, pp. 45–50. doi: 10.1159/000089047
82. Taylor B.D., Darville T., Ferrell R.E., Kammerer C.M., Roberta B., Ness R.B., Haggerty C.L. Variants in Toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with *Chlamydia trachomatis* among women with pelvic inflammatory disease. *J. Infect. Dis.*, 2012, vol. 205, no. 4, pp. 603–609. doi: 10.1093/infdis/jir822
83. Tse D.B., Young B.K. Coordinate expression of Th1/Th2 phenotypes in maternal and fetal blood: evidence for a transplacental nexus. *J. Perinat. Med.*, 2012, vol. 40, no. 2, pp. 165–170. doi: 10.1515/jpm.2011.131
84. Vega-Sanchez R., Gomez-Lopez N., Flores-Pliego A., Clemente-Galvan S., Estrada-Gutierrez G., Zentella-Dehesa A., Maida-Claros R., Beltran-Montoya J., Vadillo-Ortega F. Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, vol. 84, no. 1, pp. 100–110. doi: 10.1016/j.jri.2009.08.002
85. Viemann D., Dubbel G., Schleifenbaum S., Harms E., Sorg C., Roth J. Expression of Toll-like receptors in neonatal sepsis. *J. Pediatr. Res.*, 2005, vol. 58, no. 4, pp. 654–659. doi: 10.1203/01.pdr.0000180544.02537.fj
86. Von Bernuth H., Picard C., Puel A., Casanova J.-L. Experimental and natural infections in MyD88- and IRAK-4-deficient mice and humans. *Eur. J. Immunol.*, 2012, vol. 42, no. 12, pp. 3126–3135. doi: 10.1002/eji.201242683
87. Wang H., Ogawa M., Wood J.R., Bartolomei M.S., Sammel M.D., Kusanovic J.P., Walsh S.W., Romero R., Strauss J.F. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum. Mol. Genet.*, 2008, vol. 17, no. 8, pp. 1087–1096. doi: 10.1093/hmg/ddm381
88. Weiss K., Christiaansen A.F., Fulton R.B., Meyerholz D.K., Varga S.M. Multiple CD4+ T cell subsets produce immunomodulatory IL-10 during respiratory syncytial virus infection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 6, pp. 3145–3154. doi: 10.4049/jimmunol.1100764
89. Wiechuła B., Cholewa K., Ekiel A., Romanik M., Dolezych H., Martirosian G. HBD-1 and hBD-2 are expressed in cervico-vaginal lavage in female genital tract due to microbial infections. *Ginekol. Pol.*, 2010, vol. 81, no. 4, pp. 268–271.

90. Xu J., Yang Y., Sun J., Ding Y., Su L., Shao C., Jiang B. Expression of TLR and their association with cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells of children with acute rotavirus diarrhea. *J. Clin. Exp. Immunol.*, 2006, vol. 144, no. 3, pp. 376–381. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03079.x
91. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic. Res. Cardiol.*, 2008, vol. 103, no. 5, pp. 398–406. doi: 10.1007/s00395-008-0733-0
92. Zhang D.M., Li Y.W., Mao B.L., Qian G.S. Down-regulation of Toll-like receptor 4 is related to the tolerance to lipopolysaccharide in rat alveolar macrophages. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.*, 2003, vol. 26, no. 7, pp. 411–414.
93. Zhang J.P., Chen C., Yang Y. Changes and clinical significance of Toll-like receptor 2 and 4 expression in neonatal infections. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 130–133.

Авторы:

Караулов А.В., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Бондаренко Н.Л., к.м.н., доцент кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Воропаева Е.А., д.б.н., зам. директора ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Афанасьев М.С., д.м.н., профессор кафедры клинической аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Несвижский Ю.В., д.м.н., профессор, декан медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

Борисова О.Ю., д.м.н., доцент, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Алешкин А.В., д.б.н., MBA, руководитель лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Урбан Ю.Н., к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Борисова А.Б., младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Воропаев А.Д., младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Karaulov A.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Aleshkin V.A., PhD, MD (Biology), Professor, Director of the G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Bondarenko N.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Voropaeva E.A., PhD, MD (Biology), Deputy Director, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Afanasiev M.S., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Allergology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Nesvizhsky Y.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Dean of the Faculty for Preventive Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Aleshkin A.V., PhD, MD (Biology), MBA, Head of Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology for Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Urban Yu.N., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Borisova A.B., Junior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Voropaev A.D., Junior Researcher, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

М-КЛЕТКИ — ОДИН ИЗ ВАЖНЫХ КОМПОНЕНТОВ В ИНИЦИАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА В КИШЕЧНИКЕ

А.С. Быков, А.В. Караулов, Д.А. Цомартова, Н.Л. Карташкина, В.Л. Горячкина, С.Л. Кузнецов, Д.А. Стоногина, Е.В. Черешнева

ФГБОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Микроскладчатые клетки (М-клетки) представляют собой специализированные эпителиальные клетки кишечника, которые инициируют мукозальный иммунный ответ. Эти уникальные фагоцитирующие эпителиальные клетки специализированы для передачи широкого спектра антигенных частиц и микроорганизмов через фолликуло-ассоциированный эпителий (FAE) в лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (GALT) посредством процесса, называемого транцитозом. Молекулярная основа поглощения антигена М-клетками была постепенно идентифицирована в последнее десятилетие. Активный отбор проб кишечного антигена инициирует регулируемые иммунные ответы, которые обеспечивают гомеостаз кишечника. Доставка люминальных веществ через эпителий кишечника в иммунную систему является критическим событием в иммунологическом надзоре, что приводит к толерантности к пищевым антигенам и иммунитету к патогенам (например, бактерий, вирусов и паразитов) и их токсинам. Несколько специализированных механизмов транспортирует люминальный антигена через кишечный эпителий. Большой интерес представляет открытие М-клеточно-специфических рецепторов, которые могут выступать в качестве молекулярных мишеней для целевой доставки пероральной вакцины в М-клетки. Недавние исследования показали, что М-клетки используют несколько рецепторов для распознавания и переноса специфических люминальных антигенов. Вакцинация через иммунную систему слизистой оболочки может вызывать эффективные системные иммунные ответы одновременно с иммунитетом слизистой оболочки. Этот обзор имеет целью продемонстрировать молекулы, экспрессируемые на М-клетках и используемые в качестве рецепторов иммунологического надзора для отбора патогенных микроорганизмов в кишечнике, отметить как некоторые патогены используют М-клетки для инфицирования хозяина, и, наконец, показать как эти знания используются для специфического «нацеливания» антигенов на М-клетки, чтобы попытаться повысить эффективность мукозальных вакцин. В последнее время был достигнут существенный прогресс в понимании факторов, влияющих на развитие и функционирование М-клеток.

Ключевые слова: антиген, GALT, М-клетки, RANKL, транцитоз, мукозальный иммунитет, вакцины.

M CELLS ARE THE IMPORTANT POST IN THE INITIATION OF IMMUNE RESPONSE IN INTESTINE

Bykov A.S., Karaulov A.V., Tsomartova D.A., Kartashkina N.L., Goriachkina V.L., Kuznetsov S.L., Stonogina D.A., Cheresheva Ye.V.

First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Abstract. Microfold cells (M cells) are specialized intestinal epithelial cells that initiate mucosal immune responses. These unique phagocytic epithelial cells are specialized for the transfer of a broad range of particulate antigens and microorganisms across the follicle-associated epithelium (FAE) into the gut-associated lymphoid tissue (GALT) by a process termed transcy-

Адрес для переписки:

Быков Анатолий Сергеевич
103009, Россия, Москва, ул. Моховая, 11–10,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова.
Тел.: 8 916 494-35-43 (моб.). E-mail: bykov@imail.ru

Contacts:

Anatoly S. Bykov
103009, Russian Federation, Moscow, Mokhovaya str., 11–10,
Sechenov First Moscow State Medical University.
Phone: +7 916 494-35-43 (mobile). E-mail: bykov@imail.ru

Библиографическое описание:

Быков А.С., Караулов А.В., Цомартова Д.А., Карташкина Н.Л., Горячкина В.Л., Кузнецов С.Л., Стоногина Д.А., Черешнева Е.В. М-клетки один из важных компонентов в инициации иммунного ответа в кишечнике // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 263–272. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-263-272

Citation:

Bykov A.S., Karaulov A.V., Tsomartova D.A., Kartashkina N.L., Goriachkina V.L., Kuznetsov S.L., Stonogina D.A., Cheresheva Ye.V. M cells are the important post in the initiation of immune response in intestine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 263–272. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-263-272

tosis. The molecular basis of antigen uptake by M cells has been gradually identified in the last decade. Active sampling of intestinal antigen initiates regulated immune responses that ensure intestinal homeostasis. The delivery of luminal substances across the intestinal epithelium to the immune system is a critical event in immune surveillance resulting in tolerance to dietary antigens and immunity to pathogens (e.g., bacteria, viruses, and parasites) and their toxins. Several specialized mechanisms transport luminal antigen across the gut epithelium. Discovery of M cell-specific receptors are of great interest, which could act as molecular tags for targeted delivery oral vaccine to M cells. Recent studies demonstrated that M cells utilize several receptors to recognize and transport specific luminal antigens. Vaccination through the mucosal immune system can induce effective systemic immune responses simultaneously with mucosal immunity. How this process is regulated is largely unknown. This review aims to show a new understanding of the factors that influence the development and function of M cells; to show the molecules expressed on M cells which appear to be used as immunosurveillance receptors to sample pathogenic microorganisms in the gut; to note how certain pathogens appear to exploit M cells to inject the host; and, finally, how this knowledge is used to specifically "target" antigens to M cells to attempt to improve the efficacy of mucosal vaccines. Recently, substantial progress has been made in our understanding of the factors that influence the development and function of M cells.

Key words: antigen, GALT, M cells, RANKL, transcytosis, mucosal immunity, vaccines.

Иммунная система слизистой оболочки кишечника обеспечивает первую линию защиты от орально приобретенных патогенов. Для эффективного иммунного ответа слизистой оболочки, антигены в просвете кишечника должны сначала переноситься через кишечный эпителий в лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (gut-associated lymphoid tissue, GALT).

Как известно, эпителиальная выстилка кишечника включает 6 различных типов клеток: энтероциты, бокаловидные клетки, энтероэндокринные клетки, клетки Панета, пучковые клетки (tuft cells) и М-клетки. Эти клетки в той или иной степени принимают участие в защитной функции слизистой оболочки. Так, даже энтероциты могут захватывать определенные антигены из просвета кишечника [32]. Эти антигены проходят через базолатеральные стороны энтероцитов, затем попадают в межклеточное вещество собственной пластинки слизистой оболочки, где их фагоцитируют макрофаги и дендритные клетки. Помимо этого, иногда отросток дендритной клетки проникает между соседними энтероцитами, проходя сквозь плотный контакт, выходит на поверхность энтероцитов («эффект перископа»), где и захватывает антигены. Даже сквозь муцин-секретирующие бокаловидные клетки проходят растворимые антигены с низкой молекулярной массой в межклеточное вещество собственной пластинки слизистой оболочки, где их «встречают» дендритные клетки [42]. Как и бокаловидные клетки, энтероэндокринные клетки, за исключением К-клеток [glucose-dependent insulin tropic polypeptide (также называемые gastric inhibitory polypeptide)], эффективно захватывают люминальные антигены и, следовательно, могут выступать посредником в инициации антиген-специфического адаптивного иммунитета в кишечнике [44]. Маркером специфической субпопуляции энтероэндокринных клеток является Клаудин-4 — интегральный мембранно-белковый компонент плотных соединений.

Не менее интересна роль пучковых клеток тонкой кишки, количество которых заметно увеличивается при глистной инвазии [44]. Пучковые клетки способствуют элиминации

паразитов путем продукции IL-25. Этот цитокин активизирует ILC2 (innate lymphoid cells, лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2 типа), секретирующие IL-13, который индуцирует Th2-ответ (с накоплением в ткани эозинофилов и переключением в В-клетках синтеза иммуноглобулинов на IgE), приводящий к увеличению числа пучковых клеток и дифференциации бокаловидных клеток.

Особая роль в иммунной системе кишечника принадлежит микрокладчатым клеткам (М-клеткам) фолликуло-ассоциированного эпителия, который покрывает люминальные поверхности Пейеровых бляшек [65]. Эпителий в области Пейеровой бляшки содержит 5–10% М-клеток [21, 59]. Эти клетки нередко называют иммунонаблюдательными постами в кишечном эпителии. М-клетки в отличие от соседних энтероцитов имеют уменьшенную цитоплазму из-за наличия базолатерального кармана. Они транспортируют через апикальную мембрану к базолатеральной поверхности неинфекционные частицы, паразитов, вирусы и бактерии, включая *Brucella abortus* 48, *Salmonella Typhimurium* [64, 65], *Yersinia enterocolitica* [67], полиовирусы [58], ВИЧ 3, норовирусы [15, 31, 67] и реовирусы [15]. Таким образом микроорганизмы используют трансцитозную активность М-клеток для пересечения кишечного эпителия и инфицирования хозяина. Интересно, что передаваемый через пищу ботулинический нейротоксин, сохранял токсичность после трансцитоза через М-клетку [41]. Захваченные из просвета кишки антигены, попав в базолатеральный «карман» М-клетки, контактируют с укрытыми под эпителиальным куполом Пейеровой бляшки антиген-презентирующими клетками. Последние представляют информацию об антигене Т-клеткам, индуцируя их дифференцировку. CD4⁺ Т-клетки, в свою очередь, активируют В-клетки, что, в конечном итоге, приводит к образованию плазмочитов и продукции иммуноглобулинов.

Оральное инфицирование в отсутствие М-клеток (иерсиниями — *Y. enterocolitica*, прионами, реовирусами и мышинными норовирусами) или блокируется или уменьшается [37, 59]. Интересно, что некоторые патогены могут

модулировать роль М-клеток при заборе антигена. *Salmonella Typhimurium* и R36a штамм *Streptococcus pneumoniae* способны индуцировать трансдифференцировку эпителиальных клеток в М-клетки и/или усиливать транзитозную активность М-клеток, способствуя инвазии и колонизации хозяина [37, 59]. Захваченные из просвета кишки антигены, попав в «карман» М-клетки, контактируют с укрытыми под эпителиальным куполом Пейеровой бляшки антигенпрезентирующими клетками.

М-клетки впервые были описаны в 1965 г. в эпителии аппендикса кролика. Сначала эти клетки были названы лимфоэпителиальными. В дальнейшем при изучении кишечного эпителия человека было показано наличие микроскладок на апикальной поверхности клеток [49]. Среди других особенностей, описанных в данной литературе, необходимо отметить: тонкий слой гликокаликса, небольшое количество лизосом и митохондрий, наличие базолатерального «кармана», в котором были обнаружены дендритные клетки, макрофаги и лимфоциты [47]. Отмечены также ультраструктурные отличия М-клеток, в зависимости от вида животного и области расположения [14, 43]. Охарактеризованы клеточные фенотипы фолликулярно-ассоциированного эпителия и М-клеток [18]. Необходимо подчеркнуть, что М-клетки имеются не только в кишечном эпителии, но и в эпителии воздухоносных путей дыхательной системы, способствуя доставке антигенов в иммунную систему [13, 64]. Описаны плотные контакты и десмосомы между М-клетками и соседними энтероцитами. Плотные контакты функционируют как сито, которое пропускает ионы и электролиты, но предотвращает перенос больших молекул. Это парацеллюлярный путь, опосредующий перенос веществ (размером от 0,3 до 1,0 нм) через межклеточное пространство между кишечными эпителиальными клетками [12].

М-клетки — главные ворота доставки люминальных антигенов и инициаторы антиген-специфических иммунных реакций. При этом особая роль принадлежит секреторному IgA (SIgA), который способствует поглощению и доставке антигенов в составе иммунных комплексов из просвета кишечника субпопуляциям дендритных клеток, расположенных в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (GALTs), и влияет на воспалительные реакции, обычно связанные с поглощением патогенных микробов и потенциально аллергенных антигенов. Это свойство SIgA связывать антиген и проникать, с помощью М-клетки в Пейерову бляшку, называется обратным транцитозом. В обратном экзоцитозе SIgA участвуют рецептор Dectin-1 и корецептор Siglec-5, экспрессированные на М-клетке [53]. Это реальная возможность доставки антигена в слизистую оболочку кишечника, используя SIgA в качестве носителя. SIgA, избирательно связываясь рецепторами

М-клеток, переносится через эпителий к дендритным клеткам, присутствующим в области субэпителиального купола, в конечном счете вызывая их созревание и миграцию в межфолликулярные области. При этом SIgA нейтрализует микробы и эндотоксины в эпителиальных клетках без повреждения тканей [6, 53].

Механизм дифференцировки М-клеток

Источником развития М-клеток являются Lgr5⁺-стволовые клетки основания крипт кишечного эпителия, которые экспрессируют Lgr5 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5) [5]. Дальнейшая дифференцировка связана с появлением специфического сигнала из клеток, находящихся в собственной пластинке. Этот сигнал относится к суперсемейству TNF-лиганд рецептора — активатора NF-κB — RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand). RANKL (также известный как TNFSF11) стимулирует дифференцировку М-клеток [27, 39]. Энтероциты в фолликулоассоциированном эпителии экспрессируют RANK (рецептор RANKL) и стимулируются RANKL для дифференцировки в М-клетки. Нейтрализация *in vivo* RANKL блокирует дифференцировку М-клеток, а Пейеровы бляшки от RANKL-дефицитных мышей не имеют М-клеток [27]. Терминальная дифференцировка М-клеток обусловлена экспрессией фактора транскрипции Spi-B (белковый фактор транскрипции из семейства ETS). Необходимо отметить, что появление фактора Spi-B индуцировано RANKL. Именно фактор Spi-B регулирует созревание незрелых М-клеток в функционально активные М-клетки [10, 20, 21]. Более того, этот фактор регулирует специфически зависимый транцитоз антигенов через М-клетки [4, 56].

Дифференцировка и созревание М-клеток зависит также и от В-клеток, секретирующих цитокины и располагающихся, как правило, в большом количестве под эпителием, в непосредственной близости к М-клеткам [38]. Кроме этого, В-клетки выделяют фактор RANKL, который связывается со своим RANKL-рецептором (TNFR SF 11a). Последний активирует специфический сигнальный путь и вызывает экспрессию Spi-B, который определяет детерминацию и созревание М-клеток. Косвенным подтверждением зависимости дифференцировки от В-клеток является уменьшение количества М-клеток у мышей с дефицитом хемокинового рецептора CCR6. При этом было отмечено значительное уменьшение количества В-клеток [36].

В устойчивом состоянии, функционально зрелые М-клетки ограничиваются фолликулярно-ассоциированным эпителием, находящимся на Пейеровых бляшках, и редко встречаются в ворсинках эпителия. Однако системная RANKL-обработка значительно увеличивает обилие зрелых М-клеток в Пейеровых бляшках и на ворсинках эпителия [27].

Кроме того, сообщалось, что повышенное количество М-клеток в эпителии кишечника после системной RANKL-терапии улучшает захват перорально вводимых антигенов из просвета кишечника и тем самым улучшает антигенспецифический иммунитет к слизистой оболочке [39]. Таким образом, глубокое понимание молекулярных механизмов, которые лежат в основе RANKL-опосредованной индукции дифференцировки М-клеток в кишечнике, может привести к идентификации новых механизмов для усиления иммунитета слизистой оболочки или к разработке стратегий блокирования фекально-орального механизма передачи инфекций.

На дифференцировку М-клеток также влияют кишечные микробы, в том числе патогенные. Так, энтероинвазивная бактерия *Salmonella Typhimurium* и другие патогены не только внедряются в М-клетки, но и секретируют протеин-эффектор секреторной системы III типа SOP-B, который индуцирует быструю дифференцировку М-клеток. Интересно отметить, что продукцию SOP-B стимулирует RANKL благодаря WNT-сигналу канонической сигнализации [54, 59].

Свойства М-клеток

Важным начальным этапом эффективного ответа М-клеток ЖКТ на появление антигенов является транцитоз. Причем, М-клетки способны захватывать частицы от 50 нм до 10 мкм. Размер частиц является важным фактором, влияющим на поглонительную способность М-клеток. В настоящее время выделяют 3 возможных пути поступления антигенов в М-клетки [53].

Первый путь — это неспецифический транцитоз связанный с образованием клатрин-окаймленных пузырьков (везикул), актин-зависимым фагоцитозом или макропиноцитозом.

Второй путь обеспечивается наличием специфических рецепторов (см. ниже), цитоскелета, компоненты которого образованы не только цитокератином, вилином и виментином, но также и туннельными нанотрубками [2, 12]. Туннельные нанотрубки (ТНТ) представляют собой новый путь межклеточной коммуникации в виде цитоплазматических удлинений на основе актина, которые растягиваются между клетками в форме нанотрубчатых каналов (50–200 нм), обнаруженных А. Rustom et al. [55]. Как полагают, это тонкие мембранные каналы, обеспечивающие перемещение различных компонентов внутри и между клетками [12, 16]. Есть предположение, что патогены могут использовать туннельные нанотрубки — каналы, способствующие их рассеиванию в клетках или манипулированию иммунным ответом с помощью перемещения иммуносупрессивных факторов от пораженных клеток к популяции иммунных клеток [37].

Кроме того, возможен третий путь, при котором отростки дендритных клеток могут про-

никать на люминальную поверхность благодаря наличию в М-клетках внутриклеточных каналов или трансклеточных пор (trancellular pores) [33]. Дендритные клетки также могут захватить из просвета кишечника антигены с помощью отростка, который проходит сквозь плотный контакт, выходит на поверхность энтероцитов («эффект перископа»), где и захватывает антигены.

Как было показано, М-клетки транспортируют бактерии, вирусы, паразитов и неинфекционные частицы со своей поверхности к базолатеральным карманам благодаря наличию специфических рецепторов на их апикальной поверхности. Так, например, гликопротеин GP2 (glycosylphosphatidylinositol) — специфический маркер зрелых М-клеток, расположенный на их поверхности [60], селективно связывает клеточную стенку (наружную мембрану) определенных патогенных и комменсальных бактерий [17, 59]. GP2 может взаимодействовать с адгезивным белком FimH фимбрий (пилей 1 типа) грамотрицательных бактерий, принимая участие в их транцитозе М-клетками. Так, GP2 мышинных М-клеток избирательно связывается с FimH-белком *Escherichia coli* и *Salmonella enterica* серовара *Typhimurium* [17]. Таким образом, было показано, что GP2, экспрессированный на М-клетках Пейровых бляшек, служит в качестве эндоцитозного рецептора для люминальных антигенов. Установлено, что GP2-зависимый транцитоз важен для иммунного наблюдения (immunosurveillance) FimH⁺-бактерий в просвете кишечника. В отсутствие экспрессии GP2 на М-клетках транцитоз микроорганизмов затруднен. Поэтому перспективно изучение низкомолекулярных соединений, которые могут связываться с GP2-белками. Если такого рода соединение комбинируется с вакциной, то она легко может связываться с GP2, попадать в М-клетки, и давать начало ретротранспорта SIgA. Расшифровка свойств таких рецепторов может привести к дальнейшему развитию мукозных вакцин для М-клеток. GP2 синтезируется также ацинарными клетками поджелудочной железы и выпускается вместе с пищеварительными ферментами в просвет кишечника. При условии, что GP2 не расщепляется активированными ферментами, он может опсонизировать FimH-положительные бактерии (FimH⁺) в кишечнике.

Гомолог GP2, uromodulin (UMOD Tamm-Horsfall protein), экспрессия которого значительно ниже, чем экспрессия GP2, также может связывать FimH⁺ *E. coli* и принимает участие вместе с GP2 в «наблюдении» за бактериями [17].

Степень плотности распределения М-клеток в эпителии кишечника непосредственно влияет на патогенез пероральных прионных болезней и восприимчивость. На апикальной мембране М-клеток в высокой степени экспрессирован клеточный прионный белок PrP^c (cellular prion protein). М-клетки критически необходимы для первоначальной трансэпителиальной передачи

патологических прионов через эпителий кишечника в Пейеровы бляшки для развития инфекции хозяина. При отсутствии М-клеток аккумуляция прионов в Пейеровой бляшке и последующая нейроинвазия были заблокированы, что свидетельствует о транслокации прионов через эпителий кишечника в ассоциации с М-клетками [11]. Данные авторов показывают, что отсутствие или сокращение плотности М-клеток может значительно снизить восприимчивость к естественным прионным болезням, таким как новый вариант болезни Крейтцфельдта—Якоба (vCJD) и скрепи овец. PrP^{sc} также вовлечен в отбор микроорганизмов из просвета кишки. Он взаимодействует с белком теплового шока (Hsp60) *B. abortus*, который признан иммунодоминантным антигеном многих микробов. PrP^{sc} может взаимодействовать с Hsp60 и может играть важную роль в связывании и интернализации *B. abortus* в М-клетки [46]. Этот белок вместе с GP2 контролирует транзит *B. abortus*, а также экзогенных антигенов [46, 47]. Выполненные исследования свидетельствуют о том, что такие факторы, как инфекция, вызванная патогенными микроорганизмами, воспаление и старение, которые меняют плотность М-клеток в кишечнике, могут быть важными факторами риска, влияющими на подверженность перорально приобретенным прионным инфекциям [11]. Поэтому М-клеточные специфические маркеры могут быть использованы для доставки антигена в иммунные индуктивные сайты слизистой оболочки.

Не так давно были опубликованы данные относительно роли люминального АТФ и экспрессии P2X7R (pore forming receptor) на апикальной поверхности М-клеток. Причем АТФ при непрерывном стимулировании P2X7R способствует необратимому образованию пор в плазматической мембране. Эти поры разрешают свободный вход ионов, гидрофильных растворенных веществ до 900 Da и бактериальных продуктов. Стимуляция М-клеток люминальным АТФ через пуриnergический рецептор P2X7R может способствовать развитию воспалительных ответов, индукции оксида азота, IL-1 β , IL-2, IL-6 и TNF α и формированию провоспалительного микроокружения в Пейеровых бляшках. P2X7R экспрессирован в апикальной области М-клеток, его стимуляция АТФ способствует продукции провоспалительных цитокинов через P2X7R-сигнализацию. Сообщается, что активация P2X7R в ворсинках клеток кишечного эпителия тесно ассоциирована с регуляцией воспалительных заболеваний кишечника. Эти результаты показывают, что P2X7R является потенциальным иммунным модулятором, индуцирующим антиген-специфический иммунный ответ в Пейеровых бляшках, которые являются индуктивными сайтами мукозального иммунитета. Полагают, что P2X7R в М-клетках

не только играет роль иммунного модулятора через стимуляцию люминальным АТФ, но также может рассматриваться как рецептор (антиген-мишень) в мукозальной вакцинации [25]. Помимо АТФ, микробопроизводные молекулы, например, короткоцепочечные жирные кислоты (бутираты и др.), а также флагеллин могут функционировать как иммунные посредники между микробиотой кишечника и иммунной системой слизистой оболочки [1].

Следует отметить еще один важный рецептор — C5aR на поверхности М-клеток, индуцирующий иммунный ответ, особенно при инфицировании *Yersinia enterocolitica*. Это объясняется тем, что лиганд М-клеток «Col» имеет гомологичные последовательности с OmpH *Y. enterocolitica*, и каждый из этих пептидов может связываться с C5aR на апикальной поверхности М-клеток. Конъюгация антигенов с Col или OmpH может способствовать их доставке через М-клетки в Пейеровы бляшки и стимулировать мукозальный иммунный ответ после перорального введения [24].

Существуют ряд других специфических белков М-клеток, которые селективно связывают компоненты патогенных микроорганизмов. Например, пептидогликан-распознающий протеин — PgLp1 (Peptidoglycan recognition protein) является белком врожденного иммунитета, связывающийся с бактериальным пептидогликаном [63]. Кроме того, ANXA5 (Аннексин V) экспрессированный на М-клетках, может связывать с высоким сродством грамотрицательные бактерии через липидный А домен липополисахарида (LPS) [51]. При этом активность LPS как эндотоксина блокируется, обеспечивая противовоспалительную роль для защиты хозяина против LPS-опосредованной эндотоксинемии. Возможно ANXA5 М-клеток действует как LPS-рецептор для связывания и поглощения грамотрицательных бактерий.

Связующую и активирующую функцию выполняют Toll-подобные рецепторы (TLR-4) [2]. Помимо TLR-4 были выявлены другие важные, патоген-распознающие рецепторы: TLR-2 связываются с грамположительными бактериями; $\alpha 5\beta 1$ -интегрин, который благодаря эндогенному фибронектину, связывается с фибронектин-связующими белками поверхности многих бактерий [57, 61].

Следует также отметить, что белок плотных соединений (tight junction) Клаудин-4, расположенный между энтероцитами и Пейеровой бляшкой, регулирует проницаемость слизистой оболочки кишечника. Хотя Клаудин-4 обычно встречается в плотных соединениях, было также обнаружено его перераспределение в цитоплазме М-клеток, что может быть частью механизма эндоцитоза частиц. Клаудин-4-связывающие белки могут быть эффективными посредниками М-клеток, поглощающих антигены в Пейеровых

бляшках, и способствующих эффективности мукозального IgA-ответа [35]. С-терминальный домен энтеротоксина *Clostridium perfringens* связывается Клаудином-4 М-клеток. Показано, что Клаудин-4 М-клеток связывает пептиды, конъюгированные с С-терминальным доменом энтеротоксина *Clostridium perfringens* [34].

За последние 10 лет появились описания свойств новых рецепторов на поверхности М-клеток: Дектин 1 (с которым селективно связывается sIgA), кластерин, катепсин Е, секретогранин V и другие, способные выполнять определенную роль в жизнедеятельности М-клеток. Однако их специфическая функция изучена недостаточно [62].

Наличие описанных выше рецепторов на М-клетках играет весьма необычную роль. Дело в том, что различные патогены могут использовать М-клетки для инфицирования организма. Описана роль М-клеток, как входных ворот для *Listeria monocytogenes* [8], *Mycobacterium avium* подвид *paratuberculosis*, *Salmonella* Typhimurium, ВИЧ [3], вируса гриппа [13], полиовируса и реовируса [15, 19]. Норовирусы (NoVs) и реовирусы проходят кишечный эпителиальный барьер через М-клетки. Что касается реовирусов, то белок сигма 1 ($\sigma 1$) внешнего капсида реовируса связывается с альфа ($\alpha 2$, $\alpha 3$)-сиаловой кислотой М-клеток. Связанный реовирус эндцитируется М-клеткой в клатрин-покрытой ямке и переносится в ее интраэпителиальный карман и субэпителиальную ткань, где может инфицировать многие типы клеток [19]. Недавно было показано, что М-клеточному транзитозу способствует воспалительный фактор 1 аллотрансплантата мыши Aif1 (allograft inflammatory factor 1) посредством активации $\beta 1$ -интегрина. Aif1-дефицитные мыши показали снижение опосредованного М-клетками поглощения частиц и транслокацию *Y. enterocolitica* [26]. Приведенные выше примеры показывают, что, несмотря на то, что «определение» кишечных антигенов М-клетками является важным звеном для запуска специфического иммунитета, эта функция может являться ахиллесовой пятой, делая возможным проход микроорганизмов или их токсинов через эпителий слизистой оболочки.

Роль М-клеток для создания оральных мукозальных вакцин

Хотя поглощение антигена М-клетками ранее считалось неспецифическим, многие недавние исследования показали, что задействован специфический механизм доставки антигена [37]. Данные нескольких независимых исследований показывают, что специфическое нацеливание вакцинных антигенов на М-клетки является эффективным средством индуцирования антигенспецифического иммунного ответа на слизистую оболочку [48].

В последнее время возрастает интерес к пероральной иммунизации и иммунотерапии при инфекционных, аллергических, аутоиммунных заболеваниях, что связано с простотой ее применения, безопасностью и антиген-специфическими особенностями действия. Учитывая, что в основном инфицирование происходит в мукозальных участках, вполне можно предположить, что использование мукозальных вакцин для формирования иммунитета является перспективным. Недавние успешные исследования мукозальной иммунной системы и адъювантов мукозальных вакцин позволяет рассматривать их в качестве вероятных альтернатив парентеральной вакцинации [7]. Решающее значение для разработки успешных мукозальных вакцин имеет понимание роли и свойств М-клеток, а также их молекул, обеспечивающих эффективность таких вакцин. Поэтому значительный интерес представляют М-клетки, активно транспортирующие люминальные антигены патогенов и компоненты продуктов питания в Пейеровы бляшки, что приводит к индукции соответствующего иммунного ответа. Поверхностные белки в М-клетках играют определенную роль не только как посредники транспорта люминальных антигенов, но и как индикаторы отличий этих клеток от других энтероцитов [62].

Теперь очевидно, что антигены, поставляемые носителем, лучше распознаются врожденной иммунной системой, чем растворимый антиген, и в меньшей степени подвержены воздействию суровой среды слизистой оболочки. Идеальная система доставки требует эффективной инкапсуляции, защиты антигена от ферментативной деградации и способности пересекать эпителий через М-клетки для доступа к лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (Mucosus-Associated Lymphoid Tissue — MALT).

Несмотря на успешное применение нескольких оральных мукозных вакцин, их количество в настоящее время весьма ограничено по сравнению с количеством парентеральных вакцин. Это ограниченное использование оральных мукозальных вакцин тесно связано с отсутствием эффективной системы доставки антигена и эффективных адъювантов для стимулирования иммунитета из-за особенности мукозальной иммунной системы, которая имеет низкую эффективность в доставке антигена в индуктивном сайте и склонность к индукции оральной толерантности.

Научные интересы к разработке эффективных мукозальных вакцин были направлены на М-клетки потому, что М-клетки являются важными эффекторами в доставке антигена и инициаторами антигенспецифического мукозального иммунитета. М-клеточные специфические маркеры могут быть использованы для доставки антигена в иммунные индуктивные сайты слизистой оболочки [17, 46, 48, 51]. Так, клеточно-специфические антитела против α -1,2-фукозы

углеводной части М-клеток могут использоваться для усиления доставки ассоциированного антигена [48]. Эти антитела обладают большей специфичностью, нежели лектин Ulex europaeus agglutinin I (UEA-1), который также связывает α -1,2-фукозу с высоким аффинитетом. Между тем имеются ограничения в понимании свойств поверхностных молекул и маркеров в апикальной области М-клеток. Эта трудность была частично преодолена путем создания *in vitro* модели культуры М-подобных клеток человека и их идентификации специфическими антителами [48].

Оральная мукозальная среда постоянно подвергается воздействию огромного количества антигенов, такие как компоненты пищи и микроорганизмов, поэтому оральная толерантность играет ключевую роль в иммунном гомеостазе слизистых оболочек [50]. М-клетки активно транспортируют просветные антигены продуктов питания, вирусов и бактерий в Пейеровы бляшки, это приводит к индукции соответствующего иммунного ответа. Вместе с тем при вакцинации важное значение придается адьювантам протективных антигенов. Такие агонисты TLR, как мурамилдипептид, монофосфатный липид А и флагеллин являются основными кандидатами для адьювантов мукозальных вакцин потому, что они могут объединять реакции врожденного и адаптивного иммунитета [7, 40]. Лиганды патогенных микроорганизмов, взаимодействуя со специфическими маркерами М-клеток, могут играть роль мукозальных адьювантов для совершенствования Т-клеточного иммунитета без индукции оральной толерантности. Например, протеин Н наружной мембраны (OmpH) *Y. enterocolitica* взаимодействует с рецептором C5aR на М-клетках и может не только повысить доставку антигена в иммунный индуктивный сайт слизистой, но также способствует индукции антигенспецифического иммунного ответа [22, 24].

Хотя М-клетки считаются основным каналом транспорта кишечного антигена возможны и взаимодополняющие пути транспорта подобных антигенов, которые могут обеспечить оптимальный иммунитет после пероральной вакцинации. Использование анти-RANKL-антител для временного истощения *in vivo* М-клеток выявило возможность поступления антигена через другие клетки [9].

Вероятно, бокаловидные клетки поставляют антигены в антигенпрезентирующие клетки через экзосомы аналогично энтероцитам. Таким образом бокаловидные клетки, как и М-клетки, могут служить полезной мишенью для пероральных вакцин против патогенных микроорганизмов для повышения иммунитета при последующей мукозальной (желудочно-кишечной или легочной) инфекции. Эти клетки функционируют как шлюз для многих бактериальных и вирусных патогенов, чтобы инициировать ин-

фекцию хозяина. Таким образом, углубленное понимание перечисленных факторов может способствовать разработке новых стратегий по предотвращению инфицирования через слизистые оболочки.

За последние годы появились данные о влиянии старения на функциональную активность М-клеток [35, 52]. Было отмечено, что снижение активности, связанное со старением, вызвано уменьшением количества антиген-специфичных IgA в кишечнике. При изучении иммунитета у стареющих мышей (600 дней) было выявлено снижение количества зрелых $gp2^+$ М-клеток в Пейеровых бляшках. Более того, был снижен трансцитоз определенных антигенов [29]. Показано, что старение не влияет на экспрессию RANKL стволовыми клетками или начальную индукцию к дифференцировке, но значительно снижает экспрессию Spi-B и созревание $gp2^+$ М-клеток. Снижена также экспрессия хемокина CCL20 в эпителии старых Пейеровых бляшек. Вследствии сниженной экспрессии CCL20 привлечение клеток (включая индуцирующие М-клетки, CD11c⁺, В-клетки) к фолликулоассоциированному эпителию также снижено. Так как экспрессия Spi-B и CCL20–CCR6 играет важную роль в дифференцировке М-клеток, можно предположить, что при старении происходит значительное снижение функционально зрелых М-клеток.

Следует отметить, что дальнейшие исследования влияния старения на функциональную активность М-клеток направлено на изучение дефекта способности иммунной системы определять антигены в связанном со старением упадке антиген-специфичного иммунного ответа. Однако с тех пор как было открыто, что некоторые патогенные микроорганизмы могут использовать М-клетки для поражения организма, выявились положительные стороны снижения количества М-клеток. Например, старение может снижать ранний захват некоторых патогенов в Пейеровых бляшках и, таким образом, снижает восприимчивость к инфекции [30].

Заключение

Слизистая оболочка постоянно подвергается воздействию различных антигенов и микробиоты и тщательно регулирует поступление люминальных антигенов. Нацеливание на молекулы, специфичные к М-клеткам, может усиливать проникновение антигена, инициировать иммунный ответ и индуцировать защиту от мукозальных патогенов. Исходя из того, что М-клетки активно участвуют в инициации иммунитета, а также способствуют попаданию вирусов и бактерий в организм, в настоящее время проводятся многочисленные исследования по разработке мукозальных вакцин. М-клеточные специфические маркеры могут быть использо-

ваны для доставки антигена в иммунные индуктивные сайты слизистой оболочки. Конъюгация антигенов с лигандами для рецепторов М-клеток может опосредовать их доставку в М-клетки и индуцировать усиленные иммунные ответы слизистой оболочки после перорального введения [23]. М-клетки являются идеальными ми-

шенями для компонентов мукозальных вакцин. Последние обеспечивают защиту слизистых оболочек в дополнение к основному иммунитету, являются идеальной стратегией для предотвращения инфекционных заболеваний, большинство из которых инициированы вторжением патогенов через слизистую оболочку.

Список литературы/References

1. Быков А.С., Зверев В.В., Пашков Е.П., Караулов А.В., Быков С.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Атлас-руководство. М.: МИА, 2018, 416 с. [Bykov A.S., Zverev V.V., Pashkov E.P., Karaulov A.V., Bykov S.A. *Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya. Atlas-rukovodstvo* [Medical microbiology, virology and immunology. Atlas guide]. Moscow: MIA, 2018, 416 p.]
2. Akashi S., Saitoh S., Wakabayashi Y., Kikuchi T., Takamura N., Nagai Y., Kusumoto Y., Fukase K., Kusumoto S., Adachi Y., Kosugi A., Miyake K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 198, no. 7, pp. 1035–1042. doi: 10.1084/jem.20031076
3. Amerongen H.M., Weltzin R., Farnet C.M., Michetti P., Haseltine W.A., Neutra M.R. Transepithelial transport of HIV by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 1991, vol. 4, pp. 760–765
4. Asai T., Morrison S.L. The SRC family tyrosine kinase HCK and the ETS family transcription factors SPIB and EHF regulate transcytosis across a human follicle-associated epithelium model. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, pp. 10395–10405. doi: 10.1074/jbc.M112.437475
5. Barker N., van Es J.H., Kuipers J., Kujala P., van den Born M., Cozijnsen M., Haegbarth A., Korving J., Begthel H., Peters P.J., Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, vol. 449, pp. 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196
6. Brandtzaeg P. Gate-keeper function of the intestinal epithelium. *Benef. Microbes*, 2013, vol. 4, pp. 67–82. doi: 10.3920/BM2012.0024
7. Chen K., Cerutti A. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity*. 2010, vol. 33, no. 4. pp. 479–491. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.013
8. Chiba S., Nagai T., Hayashi T., Baba Y., Nagai S., Koyasu S. Listerial invasion protein internalin B promotes entry into ileal Peyer's patches in vivo. *Microbiol. Immunol.* 2011, vol. 55, no. 2, pp. 123–129. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00292.x
9. Cunningham A.L., Guentzel M.N., Yu J.J., Hung C.Y., Forsthuber T.G., Navara C.S., Yagita H., Williams I.R., Klose K.E., Eaves-Pyles T.D., Arulanandam B.P. M-cells contribute to the entry of an oral vaccine but are not essential for the subsequent induction of protective immunity against *Francisella tularensis*. *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 4: e0153402. doi: 10.1371/journal.pone.0153402
10. De Lau W., Kujala P., Schneeberger K., Middendorp S., Li V.S., Barker N., Martens A., Hofhuis F., DeKoter R.P., Peters P.J., Nieuwenhuis E., Clevers H. Peyer's patch M cells derive from Lgr5(+) stem cells, require SpiB and are induced by RankL in cultured "organoids". *Mol. Cell. Biol.*, 2012, vol. 32, no. 18, pp. 3639–3647. doi: 10.1128/MCB.00434-12
11. Donaldson D.S., Sehgal A., Rios D., Williams I.R., Mabbott N.A. Increased abundance of M cells in the gut epithelium dramatically enhances oral prion disease susceptibility. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 2: e1006222. doi: 10.1371/journal.ppat.1006222
12. Eugenin E.A., Gaskill P.J., Berman J.W. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell. Immunol.*, 2009, vol. 254, no. 2, pp. 142–148. doi: 10.1016/j.cellimm.2008.08.005
13. Fujimura Y., Takeda M., Ikai H., Haruma K., Akisada T., Harada T., Sakai T., Ohuchi M. The role of M cells of human nasopharyngeal lymphoid tissue in influenza virus sampling. *Virchows Arch.*, 2004, vol. 444, no. 1, pp. 36–42
14. Gebert A., Pabst R. M cells at locations outside the gut. *Semin. Immunol.*, 1999, vol. 11, no. 3, pp. 165–170. doi: 10.1006/smim.1999.0172
15. Gonzalez-Hernandez M.B., Liu T., Payne H.C., Stencel-Baerenwald J.E., Ikizler M., Yagita H., Dermody T.S., Williams I.R., Wobus C.E. Efficient norovirus and reovirus replication in the mouse intestine requires microfold (M) cells. *J. Virol.*, 2014, vol. 88, no. 12, pp. 6934–6943. doi: 10.1128/JVI.00204-14
16. Gousset K., Schiff E., Langevin C., Marjanovic Z., Caputo A., Browman D.T., Chenouard N., de Chaumont F., Martino A., Enninga J., Olivo-Marin J.C., Männel D., Zurzolo C. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.* 2009, vol. 11, no. 3, pp. 328–336. doi: 10.1038/ncb1841
17. Hase K., Kawano K., Nochi T., Pontes G.S., Fukuda S., Ebisawa M., Kadokura K., Tobe T., Fujimura Y., Kawano S., Yabashi A., Waguri S., Nakato G., Kimura S., Murakami T., Imura M., Hamura K., Fukuoka S., Lowe A.W., Itoh K., Kiyono H., Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH (+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 2009, vol. 462, pp. 226–230. doi: 10.1038/nature08529
18. Hase K., Ohshima S., Kawano K., Hashimoto N., Matsumoto K. Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells. *DNA Res.*, 2005, vol. 12, pp. 127–137.
19. Helander A., Silvey K.J., Mantis N.J., Hutchings A.B., Chandran K., Lucas W.T., Nibert M.L., Neutra M.R. The viral $\sigma 1$ protein and glycoconjugates containing $\alpha 2$ -3-linked sialic acid are involved in type I reovirus adherence to M cell apical surfaces. *J. Virol.*, 2003, vol. 77, no. 14, pp. 7964–7977. doi: 10.1128/JVI.77.14
20. Kanaja F., Ohno H. The Mechanisms of M-cell Differentiation. *Biosci. Microbiota Food Health*. 2014, vol. 33, no. 3, pp. 91–97. doi: 10.12938/bmfh.33.91
21. Kanaya T., Hase K., Takahashi D., Fukuda S., Hoshino K., Sasaki I., Hemmi H., Knoop K.A., Kumar N., Sato M., Katsuno T., Yokosuka O., Toyooka K., Nakai K., Sakamoto A., Kitahara Y., Jinnohara T., McSorley S.J., Kaisho T., Williams I.R., Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.*, 2012, vol. 13, no. 8, pp. 729–736. doi: 10.1038/ni.2352
22. Kim S.H., Jang Y.S. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines. *Exp. Mol. Med.*, 2014, vol. 46, no. 3, pp. 1–14. doi: 10.1038/emm.2013.165
23. Kim S.H., Jang Y.S. The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2017, vol. 6, pp. 15–21. doi: 10.7774/cevr.2017.6.1.15

24. Kim S.H., Jung D.I., Yang I.Y., Kim J., Lee K.Y., Nochi T., Kiyono H., Jang Y.S. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery. *Eur J. Immunol.*, 2011, vol. 41, no.11, pp. 3219–3229. doi: 10.1002/eji.201141592
25. Kim S.H., Lee H.Y., Jang Y.S. Expression of the ATP-gated P2X₇ receptor on M cells and its modulating role in the mucosal immune environment. *Immune Netw.*, 2015, vol. 15, no. 1, pp. 44–49. doi: 10.4110/in.2015.15.1.44
26. Kishikawa S., Sato S., Kaneto S., Uchino S., Kohsaka S., Nakamura S., Kiyono H. Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8: 14509. doi: 10.1038/ncomms14509
27. Knoop K.A., Kumar N., Butler B.R., Sakthivel S.K., Taylor R.T., Nochi T., Akiba H., Yagita H., Kiyono H., Williams I.R. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 2009, vol. 183, no. 9, pp. 5738–5747. doi: 10.4049/jimmunol.0901563
28. Knoop K.A., McDonald K.G., McCrate S., McDole J.R., Newberry R.D. Microbial sensing by goblet cells controls immune surveillance of luminal antigens in the colon. *Mucosal Immunol.*, 2015, vol. 8, no. 1, pp. 198–210. doi: 10.1038/mi.2014.58
29. Kobayashi A., Donaldson D.S., Erridge C., Kanaya T., Williams I.R., Ohno H., Mahajan A., Mabbott N.A. The functional maturation of M cells is dramatically reduced in the Peyer's patches of aged mice. *Mucosal Immunol.*, 2013, vol. 6, no.5, pp. 1027–1037. doi: 10.1038/mi.2012.141
30. Koga T., McGhee J. R., Kato H., Kato R., Kiyono H., Fujihashi K. Evidence for early aging in the mucosal immune system. *J. Immunol.*, 2000, vol. 165, no. 9, pp. 5352–5359. doi: 10.4049/jimmunol.165.9.5352
31. Kolawole A.O., Gonzalez-Hernandez M.B., Turula H., Yu C., Elftman M.D., Wobus C.E. Oral norovirus infection is blocked in mice lacking Peyer's patches and mature M cells. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 3, pp. 1499–1506. doi: 10.1128/JVI.02872-15
32. Kujala P., Raymond C.R., Romeijn M., Godsavage S.F., van Kasteren S.I., Wille H., Prusiner S.B., Mabbott N.A., Peters P.J. Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7(12): e1002449. doi: 10.1371/journal.ppat.1002449
33. Lelouard H., Fallet M., de Bovis B., Meresse S., Gorvel J.P. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology*, 2012, vol. 142, pp. 592–601.
34. Ling J., Liao H., Clark R., Wong M.S., Lo D.D. Structural constraints for the binding of short peptides to Claudin 4 revealed by surface plasmon resonance. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 45, pp. 30585–30595. doi: 10.1074/jbc.M803548200
35. Lo D.D., Ling J., Eckelhoefer A.H. M cell targeting by a Claudin 4 targeting peptide can enhance mucosal IgA responses. *BMC Biotechnol.*, 2012, vol. 12: 7. doi: 10.1186/1472-6750-12-7
36. Lügering A., Floer M., Westphal S., Maaser C., Spahn T.W., Schmidt M.A., Domschke W., Williams I.R., Kucharzik T. Absence of CCR6 inhibits CD4⁺ regulatory T-cell development and M-cell formation inside Peyer's patches. *Am. J. Pathol.*, 2005, vol. 166, no. 6, pp. 1647–1654.
37. Mabbott N.A., Donaldson D.S., Ohno H., Williams I.R., Mahajan A. Microfold (M) cells; important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.*, 2013, vol. 6, no. 4, pp. 666–677. doi: 10.1038/mi.2013.30
38. Mach J., Hsieh T., Hsieh D., Grubbs N., Chervonsky A. Development of intestinal M cells. *Immunol. Rev.*, 2005, vol. 206, pp. 177–189. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00281.x
39. Maharjan S., Sing B., Jiang T., Yoon S.-Y., Li H.-S., Kim G., Gu M.J., Kim S.J., Park O.J., Han S.H., Kang S.K., Yun C.H., Choi Y.J., Cho C.S. Systemic administration of RANKL overcomes the bottleneck or oral vaccine delivery through microfold cells in the ileum. *Biomaterials*, 2016, vol. 84, pp. 286–300. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.043
40. Manicassamy S., Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin. Immunol.*, 2009, vol. 21, no. 4, pp. 185–193. doi: 10.1016/j.smim.2009.05.005
41. Matsumura T., Sugawara Y., Yutani M., Amatsu S., Yagita H., Kohda T., Fukuoka S., Nakamura Y., Fukuda S., Hase K., Ohno H., Fujinaga Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nat. Commun.*, 2015, vol. 6: 6255. doi: 10.1038/ncomms7255
42. McDole J.R., Wheeler L.W., McDonald K.G., Wang B., Konjufca V., Knoop K.A., Newberry R.D., Miller M.J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 2012, vol. 483, no. 7389, pp. 345–349. doi: 10.1038/nature10863
43. Miller H., Zhang J., Kuolee R., Patel G.B., Chen W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J. Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, no. 10, pp. 1477–1486.
44. Nagatake T., Fujita H., Minato N., Hamazaki Y. Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of Claudin-4 in mouse small intestine. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, no. 3: e90638. doi: 10.1371/journal.pone.0090638
45. Nakato G., Fukuda S., Hase K., Goitsuka R., Cooper M.D., Ohno H. New approach for m-cell-specific molecules by screening comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res.* 2009, vol. 16, no. 4, pp. 227–235. doi: 10.1093/dnares/dsp013
46. Nakato G., Hase K., Suzuki M., Kimura M., Ato M., Hanazato M., Tobiume M., Horiuchi M., Atarashi R., Nishida N., Watarai M., Imaoka K., Ohno H. Cutting edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. *J. Immunol.*, 2012, vol. 189, no. 4, pp. 1540–1544. doi: 10.4049/jimmunol.1103332
47. Neutra M.R., Frey A., Kraehenuhl J.P. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 1996, vol. 86, no. 3, pp. 345–348; PMID:8756716; http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80106-3
48. Nochi T., Yuki Y., Matsumura A., Mejima M., Terahara K., Kim D.Y., Fukuyama S., Iwatsuki-Horimoto K., Kawaoka Y., Kohda T., Kozaki S., Igarashi O., Kiyono H. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* 2007, vol. 204, no. 12, pp. 2789–2796
49. Owen R.L., Jones A.L. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterol.*, 1974, vol. 66, no. 2, pp. 189–203. doi: 10.1016/S0016-5085(74)80102-2
50. Pabst O., Mowat A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.*, 2012, vol. 5, no. 3, pp. 232–239. doi: 10.1038/mi.2012
51. Rand J.H., Wu X.X., Lin E.Y., Griffel A., Gialanella P., McKittrick J.C. Annexin A5 binds to lipopolysaccharide and reduces its endotoxin activity. *MBio*, 2012, vol. 3, no.11, pii: e00292-11. doi: 10.1128/mBio.00292-11
52. Ren Z., Gay R., Thomas A., Pae M., Wu D., Logsdon L., Mecsas J., Meydani S.N. Effect of age on susceptibility to Salmonella Typhimurium infection in C57BL/6 mice. *J. Med. Microbiol.*, 2009, vol. 58, pt. 12, pp. 1559–1567. doi: 10.1099/jmm.0.013250-0
53. Rochereau N., Drocourt D., Perouzel E., Pavot V., Redelingshuys P., Brown G.D. Tiraby G., Roblin X., Verrier B., Genin C., Corthésy B., Paul S. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated sIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.*, 2013, vol. 11, no. 9: e1001658. doi: 10.1371/journal.pbio.1001658

54. Rouch J.D., Scott A., Lei N.Y., Solorzano-Vargas R.S., Wang J., Hanson E.M., Kobayashi M., Lewis M., Stelzner M.G., Dunn J.C.Y., Eckmann L., Martín M.G. Development of functional microfold (M) cells from intestinal stem cells in primary human enteroids. *PLOS one*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0148216
55. Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H.H. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 2004, vol. 303, pp. 1007–1010. doi: 10.1126/science.1093133
56. Sato S., Kaneto S., Shibata N., Takahashi Y., Okura H., Yuki Y., Kunisawa J., Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.*, 2013, vol. 6, no. 4, pp. 838–846. doi: 10.1038/mi.2012.122
57. Secott T.E., Lin T.L., Wu C.C. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect Immun.* 2004, vol. 72, no. 7, pp. 3724–3732. doi: 10.1128/IAI.72.7.3724-3732.2004
58. Siciński P., Rowiński J., Warchoń J.B., Jarzabek Z., Gut W., Szczygieł B., Bielecki K., Koch G. Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology*, 1990, vol. 98, pp. 56–58.
59. Tahoun A., Mahajan S., Paxton E., Malterer G., Donaldson D.S., Wang D., Tan A., Gillespie T.L., O'Shea M., Roe A.J., Shaw D.J., Gally D.L., Lengeling A., Mabbott N.A., Haas J., Mahajan A. *Salmonella* transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe*, 2012, vol. 12, no. 5, pp. 645–656. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.009
60. Terahara K., Yoshida M., Igarashi O., Nochi T., Pontes G.S., Hase K., Ohno H., Kurokawa S., Mejima M., Takayama N., Yuki Y., Lowe A.W., Kiyono H. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 12, pp. 7840–7846. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.7840
61. Travassos L.H., Girardin S.E., Philpott D.J., Blanot D., Nahori M.A., Werts C., Boneca I.G. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.*, 2004, vol. 5, no. 10, pp. 1000–1006.
62. Verbrugge P., Kujala P., Waelput W., Peters P.J., Cuvelier C.A. Clusterin in human gut-associated lymphoid tissue, tonsils, and adenoids: localization to M cells and follicular dendritic cells. *Histochem Cell Biol.*, 2008, vol. 129, no. 3, pp. 311–320. doi: 10.1007/s00418-007-0369-4
63. Wang J., Gusti V., Saraswati A., Lo D.D. Convergent and divergent development among M cell lineages in mouse mucosal epithelium. *J. Immunol.*, 2011, vol. 187, no. 10, pp. 5277–5285. doi: 10.4049/jimmunol.1102077
64. Wang K.C., Huang C.H., Huang C.J., Fang S.B. Impacts of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its speG gene on the transcriptomes of in vitro M cells and Caco-2 cells. *PLOS ONE*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0153444
65. Wang M., Gao Z., Zhang Z., Pan L., Zhang Y. Roles of M cells in infection and mucosal vaccines. *Human Vaccines & Immunother.*, 2014, vol. 10, no. 12, pp. 3544–3551. doi: 10.4161/hv.36174
66. Westphal S., Luger A., von Wedel J., von Eiff C., Maaser C., Spahn T., Heussipp G., Schmidt M.A., Herbst H., Williams I.R., Domschke W., Kucharzik T. Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to *Yersinia enterocolitica* infection: evidence on defective M-cell formation in vivo. *Am. J. Pathol.*, 2008, vol. 172, no. 3, pp. 671–680. doi: 10.2353/ajpath.2008.070393
67. Wobus C.E. Oral norovirus infection is blocked in mice lacking Peyer's patches and mature M cells. *J. Virol.*, 2016, vol. 90, no. 3, pp. 1499–1506. doi: 10.1128/JVI.02872-15

Авторы:

Быков А.С., д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Караулов А.В., академик РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Цомартова Д.А. к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Карташкина Н.Л. к.м.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Горячкина В.Л. к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Кузнецов С.Л., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Стоногина Д.А., студентка 5 курса ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Черешнева Е.В. к.м.н., старший преподаватель кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Bykov A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Karaulov A.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Tsomartova D.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Kartashkina N.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Goriachkina V.L., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Kuznetsov S.L., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Histology, Cytology, Embryology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Stonogina D.A., 5th Year Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Chereshneva Ye.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Histology, Cytology, Embryology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *HELICOBACTER PYLORI* С ЭПИТЕЛИЕМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА. I. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ УСПЕШНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ

О.К. Поздеев¹, А.О. Поздеева¹, Ю.В. Валеева², П.Е. Гуляев³

¹ Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования МЗ РФ, г. Казань, Россия

² ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

³ ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия

Резюме. *Helicobacter pylori* — грамтрицательная, извитая, подвижная бактерия, способная колонизировать слизистую оболочку желудка (СОЖ) человека и выживать в этих крайне неблагоприятных условиях у более чем половины населения нашей планеты. Показано, что микроорганизм может обитать на СОЖ в течение всей жизни хозяина, но при этом вызывает клинически выраженные заболевания лишь у незначительной группы инфицированных лиц. К причинам, способствующим развитию заболеваний, как правило, относят: сопутствующие инфекции желудочно-кишечного тракта, неправильную стерилизацию медицинских инструментов (как правило эндоскопов), несоблюдение правил личной гигиены, длительный контакт с инфицированными или носителями, в том числе с членами семьи, и ряд других факторов. Хорошо известно, что персистенция *H. pylori* имеет этиологическое значение в развитии широкого спектра болезней желудочно-кишечного тракта, включая хронический гастрит, язвенную болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, аденокарциному желудка и MALT-лимфомы. Глобальное распространение носительства *H. pylori* позволяет предположить наличие у бактерии «умных» стратегий, способствующих ее адаптации к агрессивной среде желудка и пожизненному персистированию в организме человека. Даже спустя 34 года после открытия микроорганизма остается множество вопросов, не имеющих своего ответа, в том числе о роли факторов патогенности, способствующих выживанию микроорганизма в суровых условиях микробиома СОЖ. Изучение и понимание механизмов, способствующих колонизации и персистированию *H. pylori*, позволит оптимизировать прогноз повышенного риска тяжелых заболеваний у лиц, колонизированных этим микроорганизмом. Сложившийся в ходе эволюции долгосрочный баланс между человеком и *H. pylori* определяет микробное постоянство в микробиоме желудка, но в ряде случаев это совместное существование приводит к риску развития вышеперечисленных тяжелых патологий. В данном обзоре предпринято обсуждение характера взаимоотношений *H. pylori* с эпителием, участие факторов патогенности бактерии (уреазы, ЛПС, комплекса поверхностных белков, токсинов и протеаз, способствующих инвазии) в колонизации и длительном персистировании на СОЖ. Приведенная информация о механизмах, связанных с колонизацией

Адрес для переписки:

Поздеев Оскар Кимович
420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова, 36,
Казанская государственная медицинская академия.
Тел.: 8 919 693-02-04 (моб.).
E-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Contacts:

Oskar K. Pozdeev
420012, Russian Federation, Kazan, Butlerova str., 36,
Kazan State Medical Academy.
Phone: +7 919 693-02-04 (mobile).
E-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Библиографическое описание:

Поздеев О.К., Поздеева А.О., Валеева Ю.В., Гуляев П.Е. Механизмы взаимодействия *Helicobacter pylori* с эпителием слизистой оболочки желудка. I. Факторы патогенности, способствующие успешной колонизации // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 273–283. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-273-283

Citation:

Pozdeev O.K., Pozdeeva A.O., Valeeva Yu.V., Gulyaev P.E. Mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* with epithelium of gastric mucosa. I. Pathogenic factors promoting successful colonization // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 273–283. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-273-283

эпителия желудка *H. pylori* позволяет создать предпосылки для более эффективной терапии заболеваний гастро-дуоденальной зоны. Сведения, представленные в данном обзоре, важны для объяснения стратегий, используемых *H. pylori* для выживания в крайне неблагоприятных условиях микробиома желудка.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, факторы патогенности, слизистая оболочка желудка, механизмы колонизации, персистенция, патогенез.

MECHANISMS OF INTERACTION OF *HELICOBACTER PYLORI* WITH EPITHELIUM OF GASTRIC MUCOSA. I. PATHOGENIC FACTORS PROMOTING SUCCESSFUL COLONIZATION

Pozdeev O.K.^a, Pozdeeva A.O.^a, Valeeva Yu.V.^b, Gulyaev P.E.^c

^a Kazan State Medical Academy — Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Russian Federation

^b Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation

^c Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Abstract. *H. pylori* is a Gram-negative, crimp and motile bacterium that colonizes the hostile microniche of the human stomach roughly one half of the human population. Then persists for the host's entire life, but only causes overt gastric disease in a subset of infected hosts. To the reasons contributing to the development of diseases, usually include: concomitant infections of the gastrointestinal tract, improper sterilization of medical instruments, usually endoscopes, non-observance of personal hygiene rules, prolonged contact with infected or carriers, including family members and a number of other factors. Clinically, *H. pylori* plays a causative role in the development of a wide spectrum of diseases including chronic active gastritis, peptic and duodenal ulceration, gastric adenocarcinoma, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Due to the global distribution of *H. pylori*, we are able to conclude that smart strategies are contributing to adaptation of the bacterium in an aggressive environment of a stomach and lifelong permanent circulation in its host. Thirty-four years after the discovery of this bacterium, there are still many unanswered questions. For example, which strategies help the bacterium to survive in this inhospitable conditions? Understanding the mechanisms governing *H. pylori* persistence will improve identification of the increased risk of different gastric diseases in persons infected with this bacterium. A well-defined and long-term equilibrium between the human host and *H. pylori* allows bacterial persistence in the gastric microniche; although this coexistence leads to a high risk of severe diseases the diseases which are listed above. In this review, we discuss the pathogenesis of this bacterium and the mechanisms it uses to promote persistent colonization of the gastric mucosa, with a focus on recent insights into the role of some virulence factors like urease, LPS, outer membrane proteins, cytotoxins, factors, promoting invasion. Information on the mechanisms related to *H. pylori* persistence can also provide the direction for future research concerning effective therapy and management of gastroduodenal disorders. The topics presented in the current review are important for elucidating the strategies used by *H. pylori* to help the bacterium persist in relation to the many unfavorable features of living in the gastric microniche.

Key words: *Helicobacter pylori*, pathogenic factors, gastric mucosa, colonization mechanisms, persistence, pathogenesis.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) — спиралевидная подвижная грамотрицательная микроаэрофильная бактерия, способная колонизировать слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки человека и различных животных. Основным биотопом бактерий является антральная часть желудка, где отсутствуют обкладочные (париетальные) клетки. Показано, что *H. pylori* обнаруживают у большей части (до 50–60%) популяции людей. В зависимости от региона проживания и возраста обследованных лиц уровни инфицированности могут варьировать от 15 до 90%, что делает его одним из самых успешных микробов-комменсалов, выживающих в экстремальных условиях желудка. При этом в большинстве случаев микробная колонизация протекает бессимптомно, но у 10–15% лиц инфицирование сопровождается клиническими проявлениями, обусловленными развитием хронического воспаления слизистой оболочки желудка (СОЖ). В подобных ситуациях наиболее часто наблюдают развитие атрофического гастрита типа В, реже язвенной болезни,

а у 0,5–2% инфицированных *H. pylori* могут развиваться злокачественные заболевания — рак желудка и MALT-лимфомы [5, 64].

Факторы, обуславливающие столь различные реакции организма хозяина на циркуляцию *H. pylori*, остаются до конца не выясненными. Результаты многочисленных исследований связывают их с вариабельностью генотипов бактерий по факторам патогенности, либо наличием вариантов полиморфных локусов генов, кодирующих синтез ключевых медиаторов про- и противовоспалительных реакций организма хозяина [16, 21, 22, 43, 69].

Факторы, способствующие выживанию и перемещению *H. pylori* в просвете желудка

Для того, чтобы выживать в условиях агрессивной среды желудка, колонизировать СОЖ и вызывать хроническое воспаление, *H. pylori* использует комплекс адаптивных механизмов.

При попадании в среду с низким рН бактерия увеличивает синтез уреазы, формамидазы, аргиназы и других ферментов, разлагающих субстраты с образованием NH_4^+ и CO_2 , что способствует образованию «аммиачного облака» вокруг бактериальной клетки с щелочным рН, нейтрализующим кислую среду желудка.

Уреаза представляет собой Ni^{2+} -содержащий гексадимер и является одним из основных маркеров колонизации *H. pylori*, и ее определение наиболее часто применяют при проведении диагностических тестов. Генный кластер уреазы содержит 7 генов: 2 структурных гена *ureA* и *ureB* (кодируют структурные субъединицы уреазы); 4 добавочных гена *ureE*, *ureF*, *ureG* и *ureH* кодируют дополнительные белки, необходимые для сборки и включения ионов Ni^{2+} в субъединицу В. Пятый добавочный ген *ureI* кодирует канал уреазы для H^+ и является транспортной системой для перемещения мочевины в цитоплазму бактерии. Синтез фермента регулируется одновременной экспрессией структурных и добавочных генов, продукты которых изначально существуют как интактные апопротеины. Для появления активной формы фермента необходимы белки UreF, UreG и UreH [62]. Уреаза *H. pylori* является несекретируемым цитоплазматическим белком, регулирующим внутреннюю концентрацию протонов посредством повышения рН в периплазме и увеличения мембранного потенциала [35]. Белок UreI образует протон-активируемый канал для мочевины, активируемый низким рН и регулирует активность уреазы через варьирование уровней внутриклеточного импорта мочевины [95]. Дополнительно алифатическая амидаза и формамидаза образуют аммиак и органические кислоты посредством гидролиза короткоцепочечных аминокислот. Активность этих ферментов регулируется двухкомпонентной системой AgsSR, состоящей из гистидинкиназы AgsS, распознающей снижение рН и OmpR-подобного регулятора ответа [65].

В желудке *H. pylori* сталкивается с непрерывным тонким слоем слизистого геля, покрывающим поверхность СОЖ. Он состоит из гликопротеинов толщиной 190–300 мкм, под которыми располагается слой бикарбонатов, прилежащий к поверхностному эпителию слизистой оболочки. Вместе они образуют слизисто-бикарбонатный барьер, защищающий эпителий от агрессивной среды и химуса в просвете желудка. В составе слизи находится комплекс антимикробных факторов, таких как иммуноглобулин А, лизоцим, лактоферрин и др. [3]. Таким образом, он представляет собой эффективную преграду для диффузии различных веществ, а также проникновения различных инфекционных агентов, впрочем, исключая *H. pylori*. В определенной степени в отношении последнего слизь играет защитную роль, так как *H. pylori*, располагаясь в ее толще, избегает

не только действия желудочного сока и антибактериальных веществ в просвете желудка, но и эффектов гуморального и клеточного иммунных ответов. Для последующей успешной колонизации *H. pylori* должен преодолеть слой слизи и вступить в контакт с эпителием СОЖ. Степень вязкости слизи определяет содержание гликопротеинов и ее рН. В нейтральной среде макромолекулы гликопротеинов формируют жидкую фракцию, а при снижении рН среды менее 4, трансформируются в вязкий полимерный гель [8]. Уреаза *H. pylori* разлагает мочевины, содержащуюся в слизи, с образованием NH_3 , что, в свою очередь, изменяет рН среды, способствуя перемещению бактерий [7]. Движению *H. pylori* в слое слизи также способствует спиральная форма, обуславливающая «винтообразное» движение со скоростью, намного превышающей движение многих палочковидных бактерий [36]. В настоящее время подвижность *H. pylori* рассматривают как важный фактор патогенности.

Факторы адгезии *H. pylori*

Важнейшим этапом колонизации *H. pylori* СОЖ является адгезия бактерий к эпителию. Ее медируют липополисахарид (ЛПС) бактерий и специализированные адгезины ОМР (outer membrane proteins, белки поверхностной мембраны). Геном *H. pylori* содержит 32 гена, кодирующих ОМР. Последние включают подгруппы Нор (Helicobacter outer membrane proteins) и Ног (Нор-related). В подгруппу Нор входят белки адгезии BabA, SabA, AlpA/B, НорZ и OipA [4].

При микроскопии окрашенных биоптатов слизистой СОЖ пациентов, инфицированных *H. pylori*, S.J. Hessey et al. (1990) установили, что на момент фиксации препарата не менее 20% бактерий оказались прикрепленными к эпителию [28]. Дальнейшее изучение влияния колонизации бактерий на ультраструктуру эпителия СОЖ показало, что *H. pylori* располагается на вершине микроворсинок и индуцирует образование «педесталов», либо прочно связывается с мембранами эпителиоцитов через фимбриальные структуры [54]. В качестве первого лиганда, взаимодействующего с клеточными рецепторами, был идентифицирован фибриллярный гемагглютинин, связывающий N-ацетилнейраминиллактозу, позднее обозначенный как НраА (*H. pylori* adhesion). Белок НраА дислоцирован по всей поверхности бактерий, включая оболочку жгутиков [6]. Кроме того, у *H. pylori* обнаружен дополнительный комплекс факторов, проявляющих свойства адгезинов *in vitro*. В частности, показано, что бактерии способны распознавать ганглиотетраозилцерамиды, ганглиотриаозилцерамиды и фосфатидилэтаноламиды через экзофермент-S-подобный адгезин с липид-связывающей специфичностью. Также идентифицирован железос-

вызывающий белок, способный неспецифически связываться с эритроцитами, буккальным эпителием и ламинином [15]. Но следует отметить, что до настоящего времени аргументированные подтверждения проявлений этих эффектов *in vivo* отсутствуют.

Липополисахарид (ЛПС). Синтез ЛПС *H. pylori* кодируют не менее 27 генов, разбросанных по всему геному бактерии. Участие ЛПС в адгезии на клетках эпителия СОЖ обусловлено наличием в боковых О-цепях ЛПС Льюис-подобных лигандов, аналогичных антигенам системы Льюис (Leb) АВО группы крови человека. Показано, что большая часть изолятов *H. pylori* (> 80%), выделенных в Европе, экспрессирует LeX и/или LeY 2 типа, тогда как < 10% штаммов — LeA и LeB 1 типа. При этом штаммы, изолированные в Восточной Азии, экспрессируют антигены 1 и 2 типов [50, 79]. Льюис-подобный антиген X О-цепи ЛПС участвует в адгезии *H. pylori* к эпителию антральной части желудка, взаимодействуя с мембранными β-галактозид-связывающим рецептором галектином-3 [102]. При этом, структура Льюис-подобных антигенов *H. pylori* может претерпевать изменения в динамике инфекции *in vivo*, а также в ходе культивирования *in vitro*. Эти фазовые вариации ЛПС адаптируют бактерии к противодействию факторов резистентности посредством имитации Льюис-фенотипа эпителия СОЖ и подобная антигенная мимикрия не дает возможности распознавать их как «чужеродные» [67]. В то же время длительное персистирование *H. pylori* может индуцировать синтез антител, перекрестно реагирующих с β-субъединицей протонной помпы (H⁺, K⁺-АТФаза), дислоцированной в каналах париетальных клеток, что, в конечном итоге, может приводить к атрофии слизистой желудка. Штаммы *H. pylori* могут экспрессировать эпитопы LeX, LeY, LeA и LeB, а антитела к ним могут реагировать с аналогичными эпитопами эпителия СОЖ [52]. К факторам, облегчающим персистенцию бактерий, также можно отнести относительно низкую иммуногенность ЛПС *H. pylori*, способствующую хроническому течению инфекции [102].

BabA (blood-group associated binding adhesin). Мишенями для BabA являются остатки фукозы льюис-подобных антигенов типа В (LeB), экспрессируемых клетками желудочного эпителия. В настоящее время идентифицированы 3 аллели гена *bab*: *babA1*, *babA2* и *babB*. Функционально активным является ген *babA2*, кодирующий образование BabA [31]. Связывание BabA Hp с LeB антигенами на поверхности эпителиоцитов активирует контакт-зависимую систему секреции IV типа, обеспечивающую непосредственную доставку эффекторных белков в цитозоль эпителиоцитов через особую «инъекционную иглу», отдаленно напоминающую конъюгационную пилу [32].

SabA (sialic acid-binding adhesin). Роль белка SabA как адгезина *H. pylori* была впервые доказана у страдающих гастритами пациентов, колонизированных штаммами, дефектными по *babA1A2* или *babA2* [44, 49]. Мишенью для SabA является димерный сиало-льеоис X-гликофинголипид (sLeX), экспрессирующийся на поверхности эпителия СОЖ [44]. Также SabA способен связывать и другие сиаловые рецепторы, например, расположенные на поверхности ламинина и эритроцитов [2, 94]. Штаммы *H. pylori* проявляют полиморфизм в связывании сиалосодержащих структур через SabA, что свидетельствует о способности бактерий адаптироваться к уровню экспрессии сиалосодержащих рецепторов на поверхности эпителия СОЖ [2]. Если для ранних этапов колонизации первостепенное значение имеет взаимодействие BabA с Льюис-подобными антигенами на эпителиоцитах, то с увеличением выраженности воспалительного ответа увеличивается экспрессия sLeX на их поверхности. Таким образом, SabA увеличивает уровни колонизации Hp воспаленной СОЖ [99].

AlpA/B (adherence-associated lipoprotein A and B). У Hp идентифицированы 2 гомологичных гена *AlpA* и *AlpB*, кодирующие поверхностные адгезины AlpA и AlpB [56, 75]. Однако до настоящего времени клеточные рецепторы для этих адгезинов остаются неидентифицированными. Для секреции AlpAB во внешней мембране бактерий формируются «β-бочкообразные» поры, внутренняя полость которых сформирована 14 трансмембранными белковыми мономерами. Штаммы *H. pylori*, дефектные по *alpA* и *alpB*, или содержащие только *alpB*, проявляют слабую адгезивную активность в отношении ламинина, свидетельствующую, что ламинин является мишенью для AlpB [56]. Показано, что взаимодействие AlpA/B с эпителиоцитами стимулирует запуск провоспалительного сигнального каскада. Мутантные штаммы *H. pylori* с делецией гена *alpAB* проявляли слабую колонизационную активность и слабо индуцировали секрецию IL-6 и IL-8 [14, 41].

HopZ (helicobacter outer protein Z). Другим поверхностным адгезином *H. pylori* является белок HopZ. Показано, что мутантные по гену *hopZ* штаммы бактерий проявляли слабую адгезию на клетки AGS *in vitro*. До настоящего времени остается неидентифицированным поверхностный рецептор, с которым взаимодействует HopZ. Ген *hopZ* является фазовариабельным, что обусловлено наличием СТ динуклеотидных последовательностей в регионе, кодирующей сигнальную последовательность [63]. Транскрипцию гена *hopZ* также регулируют изменения pH [48] и контакты с эпителиоцитами СОЖ [25].

OipA (outer inflammatory protein A). Первоначально белок OipA, кодируемый геном *hopH*, был идентифицирован как промотор синтеза интерлейкина-8 (IL-8) эпителиоцитами СОЖ, незави-

симый от активности системы IV типа секреции, так как изогенные мутантные штаммы, дефектные по гену *oipA* индуцировали слабый провоспалительный ответ эпителием СОЖ [100, 101]. Показано, что бактерии индуцируют секрецию IL-8 посредством прямого контакта с эпителиоцитами. В эпителии СОЖ регуляцию транскрипции гена цитокина осуществляет белок, подобный стимулированному интерфероном элементу ответа (ISRE), активаторный белок (AP)-1 и ядерный фактор NF-κB [78]. Позднее было установлено, что *OipA* может регулировать синтез других провоспалительных медиаторов, выраженность нейтрофильной инфильтрации СОЖ с развитием интерстициальной метаплазии, а также вызывать повреждение цитоскелета эпителиоцитов [37, 42, 53, 85, 98]. В частности, показано, что *OipA* подавляет секрецию IL-10 и созревание дендритных клеток, что способствует развитию персистирующей инфекции [49]. Влияние *OipA* на развитие стрессового ответа цитоскелета клеток реализуется через фосфорилирование киназ фокальной адгезии (ФАК), что, в свою очередь, активирует киназу стрессового ответа Erk и образование ориентированных актиновых микрофиламент (стрессовых волокон). *Cag A H. pylori* индуцирует фосфорилирование ФАК остатка Y407, тогда как *OipA* — фосфорилирование остатков Y397, Y576, Y577, Y861 и Y925, что указывает на большее влияние *OipA* на формирование стрессовых волокон [89].

Факторы *H. pylori*, повреждающие эпителий СОЖ

Помимо мощного аппарата адгезии, *H. pylori* обладает комплексом эффекторных белков, непосредственно повреждающих эпителиоциты. Их кодируют более 30 генов, дислоцированных в «острове патогенности» *Cag*. Кроме того, в нем расположены гены, кодирующие синтез компонентов систем секреции III и IV типа, обеспечивающих перенос эффекторных молекул в клетки-мишени. Интерес представляет тот факт, что способность к непосредственному взаимодействию с эпителием СОЖ проявляют не более 20% бактерий, что во многом определяет вариабельность клинических проявлений, ассоциированных с циркуляцией *H. pylori* [30].

Cag A (citotoxin associated gene A). Криптический иммунодоминантный белок *Cag A* является, очевидно, самым известным фактором вирулентности *H. pylori* и своеобразным маркером «острова патогенности» *Cag*. [55]. Ген *cagA* является уникальным, а его продукт не имеет гомологов среди других бактерий. Он присутствует не у всех штаммов *H. pylori*, и его наличие расценивают как фактор риска последующего развития язвы и болезней злокачественного роста [86]. Молекулы *CagA* транспортируются в клетку-мишень с помощью аппарата IV типа секреции, где

они становятся субстратом для внутриклеточных тирозинкиназ, через которые бактерия может вмешиваться в процессы фосфорилирования. Попав в цитоплазму клетки, молекулы *CagA* фосфорилируется тирозиновыми протеинкиназами Src и Abl по Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) мотиву в карбокси-терминальном домене [68, 82]. Фосфорилирование *CagA* приводит к нарушению межклеточных контактов, полярности и повреждению цитоскелета эпителиоцитов, а также стимулирует активность париетальных клеток [96]. В норме однослойный призматический железистый эпителий СОЖ отличает апико-базальная полярность, которую обеспечивают различные виды плотных межклеточных контактов, контролируемых цитоскелетом эпителиоцитов. Плотные межклеточные контакты формируют клеточный барьер, препятствующий свободному прохождению различных молекул, где мембраны соседних клеток максимально сближены и «сшиты» специализированными белками (клаудины, окклюдины и др.) [97, 103]. Молекула *CagA* содержит несколько остатков тирозина, пригодных для фосфорилирования, причем мутации этих сайтов способны предотвратить фосфорилирование белка *CagA* и нарушать развитие фенотипа «колибри» (удлинение и уплощение клеток эпителия, делающее их похожими на длинный узкий клюв этих птиц) [96].

Исследования последних лет выяснили функциональные свойства белка *CagL*, также кодируемого в острове патогенности *cag* [10, 38, 77, 88]. Ранее *CagL* рассматривали как компонент системы секреции IV типа, обеспечивающей транспортировку *CagA*. Позднее было установлено, что в действительности *CagL* является компонентом пилей, обеспечивающим контакт между эпителием СОЖ и бактерией [38]. В частности, *CagL* усиливает связывание инъекционного аппарата IV типа секреции с α5β1-интегриновым рецептором эпителиоцита [18, 34]. С ним также могут взаимодействовать и другие белки *Cag* (*CagY*, *CagI*) [34]. В конечном итоге, все эти взаимодействия медируют транспорт *CagA* в клетки.

Помимо белка *CagA*, по системе IV типа секреции в эпителий СОЖ могут транспортироваться компоненты клеточной стенки, в частности, пептидогликан и муропептиды. Попав в цитозоль, пептидогликан *H. pylori* распознается лигандом NOD1 (nucleotide-oligomerization domain). NOD1 относится к группе паттерн-распознающих рецепторов, располагающихся в цитоплазме и распознающих молекулы пептидогликана грамотрицательных и грамположительных бактерий в виде высококонсервативных фрагментов экзогенных молекул, ассоциированных с патогенными микроорганизмами PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Связывание собственных лигандов с паттерн-распознающими рецепторами запускает внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к активации факторов транс-

крипции, в том числе NF-κB, являющегося фактором, инициирующим синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, активирующим фагоциты и т. д. [93].

VacA (vacuolating cytotoxin A). Вакуолизирующий цитотоксин VacA — уникальный экзотоксин, аминокислотные последовательности которого не встречаются у других бактериальных или эукариотических белков. По уровню синтеза VacA является основным белком, секретируемым *H. pylori*. Изначально VacA экспрессируется как протоксин с молекулярной массой 140 kD состоящий из N-терминального сигнального пептида, центрального региона, образующего собственно токсин, и C-терминального домена-аутопортера [66, 74, 76]. В ходе секреции по IV типу центральный регион (м.м. 88 kDa) конвертируется в субъединицы А (VacAp33) и В (VacAp55). [33]. Мишенью для субъединицы В VacA являются рецептор-подобные протеины тирозинфосфатазы RPTPα и RPTPβ, а также гликозилированные трансмембранные белки на поверхности эпителиоцитов. Эти контакты запускают механизм рецептор-опосредованного эндоцитоза, обуславливающего попадание VacA в эпителиоцит [70]. Перед проникновением в клетку-мишень, под действием низкого или высокого pH протоксин переходит с активную форму [47]. После интернализации молекула VacA локализуется в мембранных микровезикулах [23], а затем с помощью протонной помпы вакуолярного типа (АТФаза V типа) закачиваются в поздние эндосомы и лизосомы. В них в неизменной форме токсин может сохраняться в течение нескольких дней [72, 81]. Активность VacA реализуется через образование анионных каналов в мембранах, обусловленное активацией АТФазы V-типа [61, 84], что понижает pH внутри вакуолей эпителиоцитов и, тем самым, обеспечивает поступление в них анионов (аммиака и др.) из внутриклеточного пространства [87, 92, 46]. Под действием разницы осмотического давления в вакуоли поступает вода, что приводит к их набуханию. Сливаясь друг с другом, вакуоли приводят к разрыву клеточной мембраны и гибели клетки [11]. При этом активность цитотоксина возрастает по мере снижения pH желудочного сока [73]. По аналогии с классическими двухкомпонентными экзотоксинами, предполагают, что субъединица В взаимодействует с мембраной, а субъединица А образует каналы [46, 70].

Кроме вакуолизации VacA оказывает и другие эффекты. На уровне клеток желудочного эпителия он нарушает функциональную активность эндосом и лизосом, индуцирует увеличение внеклеточной секреции кислых гидролаз, ингибирует клеточную пролиферацию, повреждает митохондрии, а также дезорганизует цитоскелет эпителиоцитов [19, 73]. Механизмы повреждения цитоскелета остаются до конца не выясненными, но показано, что экспозиция

эпителия желудка крыс с VacA нарушает образование «стрессовых волокон» и приводит к разрушению микротрубочек [58]. Подобный эффект VacA имеет значение не только для реализации вакуолизации, но объясняет ингибирующий эффект токсина на пролиферативный ответ клеток [59, 71]. Действуя на митохондриальную мембрану, VacA вызывает освобождение цитохрома С и индуцирует апоптоз эпителиоцитов [85]. Повреждение эпителиоцитов VacA запускает воспалительный процесс в СОЖ через синтез клетками провоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-6, IL-8, фактора некроза опухолей альфа (TNFα) и др. В свою очередь, цитокины способствуют повреждению эпителиоцитов желудка [104].

Уреаза. В слое слизи между просветом желудка и эпителием СОЖ существует градиент pH, обусловленный секрецией бикарбонатов в эпителиоцитах, что обеспечивает оптимальный pH на поверхности клеток. На поверхности эпителия под слоем слизи pH равен 6,5–7,0, в просвете желудка — 1,5–3,0. Слизь замедляет скорость обратной диффузии H⁺, в это время бикарбонаты нейтрализуют ионы водорода. Секреция бикарбонатов и слизи зависит от микроциркуляции и регулируется простагландинами, последние же постоянно синтезируются поверхностным эпителием. При усилении секреции HCl усиливается и секреция слизи. Этот градиент препятствует повреждению клеток ионами H⁺, поскольку слой слизи замедляет скорость их обратной диффузии, за это время HCO₃⁻ успевает нейтрализовать H⁺, формируя «слизисто-бикарбонатный барьер» [12]. Второй защитный барьер составляют гликопротеиновые компоненты слизи, образующие непрерывный слой и защищающие эпителий желудка от действия пептических факторов. Но этот защитный слой содержит также мочевины, поступающую посредством транссудации из плазмы крови и концентрирующуюся вблизи межклеточных промежутков [39]. Ряд авторов указывают на способность аммиака, высвобождающегося при гидролизе мочевины уреазой *H. pylori*, разрушать фосфолипидный монослой в слизи, тем самым истощать гидрофобный барьер СОЖ, что позволяет *H. pylori* преодолевать эти барьеры [45, 51]. Аммиак также резко повышает pH внутри слизистой, что приводит к увеличению содержания неионизированного вещества [90]. Показано, что неионизированный аммиак может проникать через фосфолипидные мембраны эпителиоцитов, при этом пропорционально повышению pH увеличивается его проникающая способность. В цитозоле неионизированный аммиак превращается в NH₄⁺ и OH⁻, что повышает внутриклеточный и митохондриальный pH, нарушая тем самым митохондриальное и клеточное дыхание и, как следствие, энергетический метаболизм, а в конечном счете — жизнеспособность клеток [90].

Эндопротеаза HtrA (high temperature requirement A). Эндопротеазы HtrA локализуются в периплазме бактерий и участвуют в обеспечении устойчивости бактериальной клетки к высоким температурам. Проявляют свойства сериновых протеаз и участвуют в удалении белков, поврежденных либо денатурированных в результате воздействия высокой температуры или оксидативного стресса. Эндопротеазы HtrA и гомологичные им ферменты экспрессируются в виде протеаз и шаперонов у про- и эукариот [91]. Одним из субстратов протеаза HtrA *H. pylori* является E-кадгерин [29, 40, 60]. E-кадгерин представляет собой одноцепочечную трансмембранную молекулу и является основным белком межклеточных контактов эпителиальных клеток, обеспечивающим поддержание барьерных свойств. Внеклеточная часть молекулы имеет пять гомологичных ЕС-доменов, участвующих в Ca²⁺-зависимом контакте с двумя молекулами E-кадгерина на соседних клетках. Цитоплазматический домен связан с актиновым цитоскелетом через молекулы α - и β -катенина, что обеспечивает стабильность межклеточных контактов [27]. Эндопротеаза HtrA *H. pylori* разрушает внеклеточные домены E-кадгерина и, соответственно, межклеточные контакты, что позволяет бактериями проникать в межклеточное пространство.

GGT (gamma-glutamyl transpeptidase). Сообщение о том, что гамма-глутамил трансептидаза является фактором патогенности *H. pylori* явилось полной неожиданностью, так как у других бактерий таковыми гамма-глутамилпептидазы (GGT) никогда не рассматривались [9]. В бактериальной клетке фермент располагается в пузырьках внешней мембраны и участвует во взаимодействии *H. pylori* с эпителиоцитами [57]. GGT активирует NF- κ B, стимулирует синтез IL-8, а также образование H₂O₂ эпителиоцитами. Кроме того GGT *H. pylori* повышает уровень 8-гидрокси-2-деоксигуанина, что указывает на оксидативное повреждение ДНК. Клиническую значимость GGT подтверждает высокая активность фермента у штаммов, выделенных от пациентов с язвами желудка, по сравнению с изолятами, выделенными от пациентов с диспепсиями [26]. Также GGT опосредует деградацию глутатиона с образованием веществ с прооксидантной активностью, что способствует повреждению эпителия СОЖ [20].

NAP (neutrophil-activating protein). Фактор, активирующий нейтрофилы (NAP) был впервые выделен из водных экстрактов *H. pylori* [17, 24]. Являясь цитоплазматическим белком, NAP высвобождается при разрушении бактериальной клетки. Анализ последовательности аминокислот показал, что NAP гомологичен бактериоферритинам. Бактериоферритины представляют собой олигомерные белки, формирующие полость внутри белковой глобулы. В этой полости происходит накопление Fe³⁺ в виде нетоксичных для клетки ферригидридов, формирующих минеральное ядро. Они играют исключительно важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза Fe³⁺, а также образуют прочные комплексы с ДНК. Другой важнейшей функцией бактериоферритинов является инактивация свободнорадикального окисления с использованием железа в качестве катализатора [80]. Установлено, что активность NAP *H. pylori* отличается от прочих бактериоферритинов. Он способен проходить через эпителий СОЖ и эндотелий капилляров, где стимулирует нейтрофилы и моноциты к образованию IL-12 и IL-23 [1, 13]. Эти цитокины индуцируют синтез IFN γ T-клетками и играют важную роль в развитии Th1-ответа [104]. NAP взаимодействуют с Toll-подобным рецептором TLR-2, распознающим компоненты клеточной стенки бактерий, но в отличие от прочих TLR-2 гонистов, NAP индуцирует образование IL-12 [1]. Синтез NPA и экспрессия эпителиоцитами IL-8 с последующим запуском всего провоспалительного каскада обуславливает развитие нейтрофильной инфильтрации, обнаруживаемой у 100% инфицированных лиц. Мигрирующие в СОЖ нейтрофилы повреждают эпителиальные клетки за счет выделения кислородных супероксидантов и выделения комплекса ферментов, а также продуцируют провоспалительные цитокины. В таких условиях на фоне прогрессирования воспаления в одних случаях имеют место повреждение и гибель эпителиоцитов с формированием эрозивных и язвенных дефектов, а в других постепенно формируются атрофии, метаплазии и неоплазии СОЖ.

Следствием прямого или непрямого (за счет действия растворимых продуктов) взаимодействия *H. pylori* с эпителием СОЖ является активация эпителиоцитов и усиленное образование ими сигнальных молекул, посредством которых запускается целый каскад защитных механизмов.

Список литературы/References

1. Amedei A., Cappon A., Codolo G., Cabrelle A., Polenghi A., Benagiano M., Tasca E., Azzurri A., D'Elia M.M., Del Prete G., de Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 4, pp. 1092–1101. doi: 10.1172/JCI27177
2. Aspholm M., Olfat F.O., Norden J., Sonden B., Lundberg C., Sjöström R., Altraja S., Odenbreit S., Haas R., Wadström T., Engstrand L., Semino-Mora C., Liu H., Dubois A., Teneberg S., Arnqvist A., Boren T. SabA is the *H. pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog.*, 2006, vol. 2, no. 10, pp. 110. doi: 10.1371/journal.ppat.0020110
3. Atuma C., Strugala V., Allen A., Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2001, vol. 280, no. 5, pp. 922–929. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.5.G922

4. Backert S., Clyne M., Tegtmeyer N. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun. Signal.*, 2011, vol. 9, pp. 28. doi: 10.1186/1478-811X-9-28
5. Blaser M.J., Atherton J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest.*, 2004, vol. 113, no. 3, pp. 321–333. doi: 10.1172/JCI20925
6. Carlsohn E., Nystrom J., Bolin I., Nilsson C.L., Svennerholm A.M. HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, no 2, pp. 920–926. doi: 10.1128/IAI.74.2.920-926.2006
7. Celli J.P., Turner B.S., Afdhal N.H., Keates S., Ghiran I. Kelly C.P., Ewoldt R.H., McKinley G.H., So P., Erramilli S., Bansil R. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 34, pp. 14321–14326. doi: 10.1073/pnas.0903438106
8. Celli J.P., Turner B.S., Afdhal, N.H., Ewoldt R.H., McKinley G.H., Bansil R., Erramilli S. Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition. *Biomacromolecules*, 2007, vol. 8, no. 5, pp. 1580–1586. doi: 10.1021/bm0609691
9. Chevalier C., Thiberge J.M., Ferrero R.L., Labigne A. Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, no. 5, pp. 1359–1372. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01271.x
10. Cover T.L. Role of *Helicobacter pylori* CagL in modulating gastrin expression. *Gut*, 2012, vol. 61, no. 7, pp. 965–966. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302142
11. Cover T.L., Blanke S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, vol. 3, no. 4, pp. 320–332. doi: 10.1038/nrmicro1095
12. Crampton J.R. Gastrointestinal mucus and bicarbonate – the defensive zone. *Quart. J. Med.*, 1988, vol. 67, no. 252, pp. 269–272.
13. De Bernard M., D’Elios M.M. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: Friend or foe? *Toxicon*, 2010, vol. 56, no. 7, pp. 1186–1192. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.09.020
14. De Jonge R., Durrani Z., Rijpkema S.G., Kuipers E.J., Van Vliet A.H.M., Kusters J.G. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. *J. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 53, no 5, pp. 375–379. doi: 10.1099/jmm.0.45551-0
15. Doig P., Austin J.W., Trust T.J. The *Helicobacter pylori* 19.6-kilodalton protein is an iron-containing protein resembling ferritin. *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, no. 2, pp. 557–560.
16. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E.L., Bream J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni J.F., Rabkin C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*, 2000, vol. 404, no. 6776, pp. 398–402. doi: 10.1038/35006081
17. Evans D.J., Evans D.G., Takemura T., Nakano H. Lampert H.C., Graham D.Y., Granger D.N., Kvietys P.R. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, no. 6, pp. 2213–2220.
18. Fanchi L., Park J.H., Shaw, M.H., Marina-Garcia N., Chen G., Kim Y.G., Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01059.x
19. Figura N., Vindigni C., Presenti L., Carducci A. New acquisitions in *Helicobacter pylori* characteristics. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1998, vol. 30, suppl. 3, pp. S254–S258.
20. Flahou B., Haesebrouck F., Chiers K., Van Deun K., De Smet L., Devreese B., Vandenberghe I., Favoreel H., Smet A., Pasmans F., D’Herde K., Ducatelle R. Gastric epithelial cell death caused by *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase is mainly glutathione degradation-dependent. *Cell. Microbiol.*, 2011, vol. 13, no. 12, pp. 1933–1955. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01682.x
21. Garcia-Gonzalez M.A., Lanasa A., Santolaria S., Crusius J.B.A., Serrano M.T., Pena A.S. The polymorphic IL-1/3 and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, vol. 125, no. 3, pp. 368–375. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01593.x
22. Garcia-Gonzalez M.A., Lanasa A., Savelkoul P.H.M., Santolaria S., Benito R., Crusius J.B.A., Pena. A.S. Association of interleukin 1 gene family polymorphisms with duodenal ulcer disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, vol. 134, no. 3, pp. 525–531. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02325.x
23. Garner J.A., Cover T.L. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 10, pp. 4197–4203.
24. Garrington T.P., Johnson G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 1999, vol. 11, no. 2, pp. 211–218. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80028-3
25. Giannakis M., Bäckhed H.K., Chen S.L., Faith J.J., Wu M., Guruge J.L., Engstrand L., Gordon J.I. Response of gastric epithelial progenitors to *Helicobacter pylori* Isolates obtained from Swedish patients with chronic atrophic gastritis. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, no. 44, pp. 30383–30394. doi: 10.1074/jbc.M109.052738
26. Gong M., Ling S.S., Lui S.Y., Yeoh K.G., Ho B. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology*, 2010, vol. 139, no. 2, pp. 564–573. doi: 10.1053/j.gastro.2010.03.050
27. Gumbiner B.M. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell. Biol.*, 2000, vol. 148, no. 3, pp. 399–404. doi: 10.1083/jcb.148.3.399
28. Hessey S.J., Spencer J., Wyatt J.I., Sobala G., Rathbone B.J., Axon Atr., Dixon M.F. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut*, 1990, vol. 31, no. 2, pp. 134–138. doi: 10.1136/gut.31.2.134
29. Hoy B., Löwer M., Weydig C., Carra G., Tegtmeyer N., Geppert T., Schröder P., Sewald N., Backert S., Schneider G., Wessler S. *Helicobacter pylori* HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep.*, 2010, vol. 11, no. 10, pp. 798–804. doi: 10.1038/embor.2010.114
30. Ikenoue T., Maeda S., Ogura K., Akanuma M., Mitsuno Y., Imai Y., Yoshida H., Shiratori Y., Omata M. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the cag pathogenicity island. *Clin. Diagn. Lab. Imm.*, 2001, vol. 8, no. 1, pp. 181–186. doi: 10.1128/CDLI.8.1.181-186.2001
31. Ilver D., Arnqvist A., Ögren J., Frick I.M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L., Boren T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*, 1998, vol. 279, no. 5349, pp. 373–377. doi: 10.1126/science.279.5349.373
32. Ishijima N., Suzuki M., Ashida H., Ichikawa Y., Kanegae Y., Saito I., Borén T., Haas R., Sasakawa C., Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 28, pp. 25256–25264. doi: 10.1074/jbc.M111.233601

33. Iwamoto H., Czajkowsky D.M., Cover T.L., Szabo G., Shao Z. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 450, no. 1–2, pp. 101–104. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00474-3
34. Jiménez-Soto L.F., Kutter S., Sewald X., Ertl C., Weiss E., Kapp U., Rohde M., Pirch T., Jung K., Retta S.F., Terradot L., Fischer W., Haas R. *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus exploits beta 1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 12, pp. e1000684. doi: 10.1371/journal.ppat.1000684
35. Joo J.S., Park K.C., Song J.Y., Kim D.H., Lee K.J., Kwon Y.C., Kim J.M., Kim K.M., Youn H.S., Kang H.L., Baik S.C., Lee W.K., Cho M.J., Rhee K.H. A thin-layer liquid culture technique for the growth of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2010, vol. 15, no. 4, pp. 295–302. doi: 10.1111/j.1523-5378.2010.00767.x
36. Karim Q.N., Logan R.P., Puels J., Karnholz A., Worku M.L. Measurement of motility of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* by real time computer tracking using the Hobson BacTracker. *J. Clin. Pathol.*, 1998, vol. 51, no. 8, pp. 623–628. doi: 10.1136/jcp.51.8.623
37. Kudo T., Lu H., Wu J.Y., Ohno T., Wu M.J., Genta R.M., Graham D.Y., Yamaoka Y. Pattern of transcription factor activation in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, 2007, vol. 132, no. 3, pp. 1024–1038. doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.009
38. Kwok T., Zabler D., Urman S., Rohde M., Hartig R., Wessler S., Misselwitz R., Berger J., Sewald N., König W., Backert S. *Helicobacter* exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 2007, vol. 449, no. 7164, pp. 862–866. doi: 10.1038/nature06187
39. Lichtenberger L.M. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 1995, vol. 57, pp. 565–583. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.003025
40. Löwer M., Weydig C., Metzler D., Reuter A., Starzinski-Powitz A., Wessler S., Schneider G. Prediction of extracellular proteases of the human pathogen *Helicobacter pylori* reveals proteolytic activity of the Hp1018/19 protein HtrA. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 10, pp. e3510. doi: 10.1371/journal.pone.0003510
41. Lu H., Wu J.Y., Beswick E.J., Ohno T., Odenbreit S., Haas R., Reyes V.E., Kita M., Graham D.Y., Yamaoka Y. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 9, pp. 6242–6254. doi: 10.1074/jbc.M611178200
42. Lu H., Wu J.Y., Kudo T., Ohno T., Graham D.Y., Yamaoka Y. Regulation of interleukin-6 promoter activation in gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Mol. Biol. Cell*, 2005, vol. 16, no. 10, pp. 4954–4966. doi: 10.1091/mbc.E05-05-0426
43. Machado J.C., Figueiredo C., Canedo P., Nabais S., Doorn L.J.V., Caldas C., Seruca R., Carneiro F., Sobrinho-Simões M. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 2003, vol. 125, no. 2, pp. 364–371.
44. Mahdavi J., Soudán B., Hurlig M., Olfat F.O., Forsberg L., Roche N., Angstrom J., Larsson T., Teneberg S., Karlsson K.A., Altraja S., Wadström T., Kersulyte D., Berg D.E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K.E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B.B., Arnqvist A., Hammarström L., Borén T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 2002, vol. 297, no. 5581, pp. 573–578. doi: 10.1126/science.1069076
45. Marshall B.J., Langton S.R. Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pyloridis* infection. *Lancet*, 1986, vol. 1, no. 8487, pp. 965–966. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91060-3
46. McClain M.S., Iwamoto H., Cao P., Vinion-Dubiel A.D., Li Y., Szabo G., Shao Z., Cover T.L. Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, no. 14, pp. 12101–12108. doi: 10.1074/jbc.M212595200
47. McClain M.S., Schraw W., Ricci V., Boquet P., Cover T.L. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.*, 2000, vol. 37, no. 2, pp. 433–442. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02013.x
48. Merrell D.S., Goodrich M.L., Otto G., Tompkins L.S., Falkow S. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 6, pp. 3529–3539. doi: 10.1128/IAI.71.6.3529-3539.2003
49. Monteiro M.A., St Michael F., Rasko D.A., Taylor D.E., Conlan J.W., Chan K.H., Logan S.M., Appelmeik B.J., Perry M.B. *Helicobacter pylori* from asymptomatic hosts expressing heptoglycan but lacking Lewis O-chains: Lewis blood-group O-chains may play a role in *Helicobacter pylori* induced pathology. *Biochem. Cell. Biol.*, 2001, vol. 79, no. 4, pp. 449–459. doi: 10.1139/bcb-79-4-449
50. Monteiro M.A., Zheng P., Ho B., Yokota S., Amano K., Pan Z., Berg D.E., Chan K.H., MacLean L.L., Perry M.B. Expression of histo-blood group antigens by lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains from asian hosts: the propensity to express type 1 blood-group antigens. *Glycobiology*, 2000, vol. 10, no. 7, pp. 701–713. doi: 10.1093/glycob/10.7.701
51. Moran A.P. Pathogenic properties of *Helicobacter pylori* – In response. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1997, vol. 32, no. 4, pp. 399–400.
52. Moran A.P. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Carbohydr. Res.*, 2008, vol. 343, no. 12, pp. 1952–1965. doi: 10.1016/j.carres.2007.12.012
53. Noach L.A., Rolf T.M., Tytgat G.N. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.*, 1994, vol. 47, no. 8, pp. 699–704. doi: 10.1136/jcp.47.8.699
54. Odenbreit S. Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2005, vol. 295, no. 5, pp. 317–324. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.06.003
55. Odenbreit S., Püls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*, 2000, vol. 287, no. 5457, pp. 1497–1500. doi: 10.1126/science.287.5457.1497
56. Odenbreit S., Till M., Hofreuter D., Faller G., Haas R. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, no. 5, pp. 1537–1548. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01300.x
57. Olofsson A., Vallström A., Petzold K., Tegtmeyer N., Schleucher J., Carlsson S., Haas R., Backert S., Wai S.N., Gröbner G., Arnqvist A. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.*, 2010, vol. 77, no. 6, pp. 1539–1555. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x
58. Pai R., Cover T.L., Tarnawski A.S. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 262, no. 1, pp. 245–250. doi: 10.1006/bbrc.1999.1194
59. Pai R., Sasaki E., Tarnawski A.S. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers. *Cell. Biol. Int.*, 2000, vol. 24, no. 5, pp. 291–301. doi: 10.1006/cbir.2000.0510

60. Pallen M.J., Wren B.W. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 26, no. 2, pp. 209–221.
61. Papini E., Satin B., Norais N., de Bernard M., Telford J.L., Rappuoli R., Montecucco C. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by Helicobacter pylori vacuolating toxin. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 102, no. 4, pp. 813–820. doi: 10.1172/JCI2764
62. Park J., Song J.Y., Kwon Y.C., Chung M.J., Jun J.S., Park J.W., Park S.G., Hwang H.R., Choi S.H., Baik S.C., Kang H.L., Youn H.S., Lee W.K., Cho M.J., Rhee K.H. Effect of the urease accessory genes on activation of the Helicobacter pylori urease apoprotein. *Mol. Cells*, 2005, vol. 20, no. 3, pp. 371–377.
63. Peck B., Ortkamp M., Diehl K.D., Hundt E., Knapp B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of Helicobacter pylori. *Nucl. Acids Res.*, 1999, vol. 27, no. 16, pp. 3325–3333. doi: 10.1093/nar/27.16.3325
64. Peek R.M. Jr, Crabtree J.E. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *Pathol.*, 2006, vol. 208, no. 2, pp. 233–248. doi: 10.1002/path.1868
65. Pflock M., Kennard S., Finsterer N., Beier D. Acid-responsive gene regulation in the human pathogen Helicobacter pylori. *J. Biotechnol.*, 2006, vol. 126, no. 1, pp. 52–60. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.045
66. Phadais S.H., Ilver D., Janson L., Normark S., Westblom T.U. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of Helicobacter pylori. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, no. 5, pp. 1557–1565.
67. Pohl M.A., Romero-Gallo J., Guruge J.L., Tse D.B., Gordon J.I., Blaser M.J. Host-dependent Lewis (Le) antigen expression in Helicobacter pylori cells recovered from Leb-transgenic mice. *J. Exp. Med.*, 2009, vol. 206, no. 13, pp. 3061–3072. doi: 10.1084/jem.20090683
68. Poppe M., Feller S.M., Römer G., Wessler S. Phosphorylation of Helicobacter pylori CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*, 2007, vol. 26, no. 24, pp. 3462–3472. doi: 10.1038/sj.onc.1210139
69. Rad R., Dossumbekova A., Neu B., Lang R., Bauer S., Saur D., Gerhard M., Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during Helicobacter pylori infection. *Gut*, 2004, vol. 53, no. 8, pp. 1082–1089. doi: 10.1136/gut.2003.029736
70. Reytrat J.M., Lanzavecchia S., Lupetti P., de Bernard M., Pagliaccia C., Pelicic V., Charrel M., Ulivieri C., Norais N., Ji X., Cabiaux V., Papini E., Rappuoli R., Telford J.L. 3D imaging of the 58 kDa cell binding subunit of the Helicobacter pylori cytotoxin. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 290, no. 2, pp. 459–470. doi: 10.1006/jmbi.1999.2877
71. Ricci V., Ciacci C., Zarrilli R., Sommi P., Tummuru M.K., Del Vecchio Blanco C., Bruni C.B., Cover T.L., Blaser M.J., Romano M. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation *in vitro*: role of VacA and CagA. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, no. 7, pp. 2829–2833.
72. Ricci V., Sommi P., Fiocca R., Romano M., Solcia E., Ventura U. Helicobacter pylori vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J. Pathol.*, 1997, vol. 183, no. 4, pp. 453–459.
73. Ricci V., Sommi P., Romano M. The vacuolating toxin of Helicobacter pylori: a few answers, many questions. *Digest. Liver Dis.*, 2000, vol. 32, suppl. 3, pp. S178–S181.
74. Schmitt W., Haas R. Genetic analysis of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.*, 1994, vol. 12, no. 2, pp. 307–319. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01019.x
75. Senkovich O.A., Yin J., Ekshyyan V., Conant C., Traylor J., Adegboyega P., McGee D.J., Rhoads R.E., Slepnev S., Testerman T.L. Helicobacter pylori AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infect. Immun.*, 2011, vol. 79, no. 8, pp. 3106–3116. doi: 10.1128/IAI.01275-10
76. Sewald X., Fischer W., Haas R. Sticky socks: Helicobacter pylori VacA takes shape. *Trends Microbiol.*, 2008, vol. 16, no. 3, pp. 89–92. doi: 10.1016/j.tim.2008.01.001
77. Shaffer C.L., Gaddy J.A., Loh J.T., Johnson E.M., Hill S., Hennig E.E., Mc Clain M.S., Mc Donald W.H., Cover T.L. Helicobacter pylori exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 9, pp. e1002237. doi: 10.1371/journal.ppat.1002237
78. Sharma S.A., Tummuru M.K., Blaser M.J., Kerr L.D. Activation of IL-8 gene expression by Helicobacter pylori is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, no. 5, pp. 2401–2407.
79. Simoons-Smit I.M., Appelmek B.J., Verboom T., Negrini R., Penner J.L., Aspinnall G.O., Moran A.P., Fei S.F., Shi B.S., Rudnica W., Savio A., de Graaff J. Typing of Helicobacter pylori with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, vol. 34, no. 9, pp. 2196–2200.
80. Smith J.L. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 30, no. 3, pp. 173–185. doi: 10.1080/10408410490435151
81. Sommi P., Ricci V., Fiocca R., Necchi V., Romano M., Telford J.L., Solcia E., Ventura U. Persistence of Helicobacter pylori VacA toxin and vacuolating potential in cultured gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 1998, vol. 275, no. 4, pp. 681–688.
82. Stein M., Bagnoli F., Halenbeck R., Rappuoli R., Fantl W.J., Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 43, no. 4, pp. 971–980. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02781.x
83. Suerbaum S., Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.*, 2002, vol. 347, no. 15, pp. 1175–1186. doi: 10.1056/NEJMra020542
84. Szabo I., Brutache S., Tombola F., Moschioni M., Satin B., Telford J.L., Rappuoli R., Montecucco C., Papini E., Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of Helicobacter pylori is required for its biological activity. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, no. 20, pp. 5517–5527. doi: 10.1093/emboj/18.20.5517
85. Tabassam F.H., Graham D.Y., Yamaoka Y. OipA plays a role in Helicobacter pylori-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cell. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 4, pp. 1008–1020. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01104.x
86. Tammer I., Brandt S., Hartig R., König W., Backert S. Activation of Abl by Helicobacter pylori: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology*, 2007, vol. 132, no. 4, pp. 1309–1319. doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.050
87. Tee W., Lambert J.R., Dwyer B. Cytotoxin production by Helicobacter pylori from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, vol. 33, no. 5, pp. 1203–1205.
88. Tegtmeier N., Hartig R., Delahay R.M., Rohde M., Brandt S., Conradi J., Takahashi S., Smolka A.J., Sewald N., Backert S. A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 30, pp. 23515–23526. doi: 10.1074/jbc.M109.096214

89. Teymournejad O., Mobarez A.M., Hassan Z.M., Moazzeni S.M., Ahmadabad H.N. In vitro suppression of dendritic cells by *Helicobacter pylori* OipA. *Helicobacter*, 2014, vol. 19, no. 2, pp. 136–143. doi: 10.1111/hel.12107
90. Thomsen L., Tasman-Jones C., Morris A., Wiggins P., Lee S., Forlong C. Ammonia produced by *Campylobacter pylori* neutralizes H⁺ moving through gastric mucus. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1989, vol. 24, no. 6, pp. 761–768. doi: 10.3109/00365528909093119
91. Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Fusamoto H., Kamada T., Sato N. Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia. *Gastroenterology*, 1992, vol. 102, no. 6, pp. 1881–1888. doi: 10.1016/0016-5085(92)90309-M
92. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Plaisier A., Schneeberger P., de Boer W., Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 1998, vol. 115, no. 1, pp. 58–66. doi: 10.1016/S0016-5085(98)70365-8
93. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Mémet S., Huerre M.R., Coyle A.J., DiStefano P.S., Sansonetti P.J., Labigne A., Bertin J., Philpott D.J., Ferrero R.L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.*, 2004, vol. 5, no. 11, pp. 1166–1174. doi: 10.1038/ni1131
94. Walz A., Odenbreit S., Mahdavi J., Borén T., Ruhl S. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology*, 2005, vol. 15, no. 7, pp. 700–708. doi: 10.1093/glycob/cwi049
95. Weeks D.L., Eskandari S., Scott D.R., Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*, 2000, vol. 287, no. 5452, pp. 482–485. doi: 10.1126/science.287.5452.482
96. Wessler S., Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.*, 2008, vol. 16, no. 8, pp. 397–405. doi: 10.1016/j.tim.2008.05.005
97. Wroblewski L.E., Peek R.M. Jr. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*. *Cell. Commun. Signal.*, 2011, vol. 9, pp. e29. doi: 10.1186/1478-811X-9-29
98. Wu J.Y., Lu H., Sun Y., Graham D.Y., Cheung H.S., Yamaoka Y. Balance between polyoma enhancing activator 3 and activator protein 1 regulates *Helicobacter pylori*-stimulated matrix metalloproteinase 1 expression. *Cancer Res.*, 2006, vol. 66, no. 10, pp. 5111–5120. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0383
99. Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J. Infect. Dev. Ctries*, 2008, vol. 2, no. 3, pp. 174–181.
100. Yamaoka Y., Kikuchi S., El Zimaity H.M., Gutierrez O., Osato M.S., Graham D.Y. Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 2002, vol. 123, no. 2, pp. 414–424. doi: 10.1053/gast.2002.34781
101. Yamaoka Y., Kwon D.H., Graham D.Y. AM(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 13, pp. 7533–7538. doi: 10.1073/pnas.130079797
102. Yokota S., Amano K., Hayashi S., Kubota T., Fujii N., Yokochi T. Human antibody response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: presence of an immunodominant epitope in the polysaccharide chain of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 6, pp. 3006–3011.
103. Yokota S., Okabayashi T., Rehli M., Fujii N., Amano K. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides upregulate toll-like receptor 4 expression and proliferation of gastric epithelial cells via the MEK1/2-ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect. Immun.*, 2010, vol. 78, no. 1, pp. 468–476. doi: 10.1128/IAI.00903-09
104. Zarrilli R., Ricci V., Romano M. Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage. *Cell. Microbiol.*, 1999, vol. 1, no. 2, pp. 93–99. doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00018.x

Авторы:

Поздеев О.К., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;

Поздеева А.О., ассистент кафедры терапии и семейной медицины Казанской государственной медицинской академии — филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, г. Казань, Россия;

Валева Ю.В., к.м.н., доцент кафедры неотложной медицинской помощи и симуляционной медицины ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия;

Гуляев П.Е., ассистент кафедры микробиологии, ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет МЗ РТ, г. Казань, Россия.

Authors:

Pozdeev O.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Microbiology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation;

Pozdeeva A.O., Assistant of the Department of Therapy and Family Medicine, Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation;

Valeeva Yu.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department Emergency Medical Care and Simulatory Medicine, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russian Federation;

Gulyaev P.E., Assistant of the Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Поступила в редакцию 14.02.2018
Принята к печати 22.06.2018

Received 14.02.2018
Accepted 22.06.2018

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ КОКЛЮШЕМ И ЭФФЕКТ ОТ РЕВАКЦИНАЦИИ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО И ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

А.М. Костинов¹, М.П. Костинов^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Обзор посвящен анализу заболеваемости коклюшем у детей в возрастной группе 5–7 лет, а также стратегиям иммунизации АКДС препаратами в зарубежных странах. Массовая вакцинация против коклюша началась еще в середине XX в., что способствовало снижению заболеваемости и смертности от данной инфекции, но в последнее десятилетие отмечается противоположная тенденция, заключающаяся в увеличении доли больных среди детей дошкольного, школьного возраста и взрослых. Изучены атипичные формы течения болезни и осложнения на фоне ОРВИ, респираторного микоплазмоза, цитомегаловирусной инфекции. Описаны различные варианты стратегии применения цельноклеточных и бесклеточных коклюшных вакцин в составе АКДС препаратов, а также эпидемиологический эффект внедрения дополнительной бустерной дозы вакцины детям дошкольного возраста. Аргументирована целесообразность проведения ревакцинации детей 6–7 лет в России для снижения общей заболеваемости коклюшем. Проанализированы материалы исследований, связанных с изучением свойств бесклеточной противокклюшной вакцины, таких как иммуногенность, безопасность в сравнении с цельноклеточной вакциной. Отображены основные препараты и их состав, используемые при вакцинации детей против коклюша. Предполагается, что увеличение заболеваемости среди детей и подростков вместе с появлением нетипичных форм коклюша связано с рядом факторов, таких как распространение новых генотипов бактерии *Bordetella pertussis*, появившихся вследствие мутаций, непродолжительность иммунитета после вакцинации бесклеточными препаратами по сравнению с цельноклеточными, использование более современных методов детекции возбудителя заболевания. Также отражены механизмы иммунного ответа при введении разных типов коклюшных вакцин. Заключается, что проведение ревакцинации детей 6–7 лет дополнительной пятой дозой бесклеточной вакцины против коклюша в составе АКДС препарата вместо АДС-М препарата, регламентированного в Национальном календаре профилактических прививок, благоприятно скажется на эпидемической ситуации по коклюшной инфекции в России.

Ключевые слова: коклюш, ацеллюлярная коклюшная вакцина, безопасность коклюшной вакцины, ревакцинация против коклюша, иммунитет к коклюшу.

Адрес для переписки:

Костинов Антон Михайлович
119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1,
МГУ им. М.В. Ломоносова.
Тел.: 8 (916) 618-81-05 (моб.).
E-mail: mono469@gmail.com

Contacts:

Anton M. Kostinov
119991, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1,
Lomonosov Moscow State University.
Phone: +7 (916) 618-81-05 (mobile).
E-mail: mono469@gmail.com

Библиографическое описание:

Костинов А.М., Костинов М.П. Заболеваемость коклюшем и эффект от ревакцинации детей дошкольного и школьного возраста // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 284–294. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-284-294

Citation:

Kostinov A.M., Kostinov M.P. Pertussis incidence and the effect of revaccination of preschool and school children // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 284–294. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-284-294

PERTUSSIS INCIDENCE AND THE EFFECT OF REVACCINATION OF PRESCHOOL AND SCHOOL CHILDREN

Kostinov A.M.^a, Kostinov M.P.^{b,c}

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^b Scientific Research Institute of Vaccines and Sera named after I.I. Mechnikov, Moscow, Russian Federation

^c First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russian Federation

Abstract. The review is devoted to the analysis of pertussis incidence of children in the age group of 5–7, as well as strategies of DTP immunization with the help of the drugs in foreign countries. Mass vaccination against pertussis began in the middle of the 20th century, which contributed to a reduction in incidence and mortality rate from this infection. However, in the last decade, there has been an opposite tendency of increasing incidence of patients among children under school age, school age and adults. Atypical forms of the disease and complications due to ARVI, respiratory mycoplasmosis and cytomegalovirus infections are described in the review. Various strategies for the use of whole-cell and acellular pertussis vaccines as part of DTP drugs are described, as well as the epidemiological effect of introducing an additional booster dose of vaccine to children under school age. The expediency of revaccination of children aged 6–7 in Russia is argued, which can help to reduce the overall incidence of pertussis. The research materials related to the study of the properties of acellular anti-pertussis vaccine, such as immunogenicity and safety in comparison with whole-cell vaccine, are analyzed. The main drugs and their composition, which are used to vaccinate children against pertussis, are described in the review. It is assumed, that the increase in the incidence among children and teenagers, with the appearance of atypical forms of pertussis, is associated with a number of factors, such as the spread of new genotypes of *Bordetella pertussis* bacterium, emerged from mutations, as well as short duration of immunity after vaccination with acellular drugs, in comparison with whole-cell, and the use of more modern methods of detecting the pathogen. The mechanisms of the immune response due to different types of pertussis vaccines are also reviewed. It is concluded, that revaccination of children aged 6–7 with an additional fifth dose of an acellular vaccine against pertussis, as part of the DTaP instead of the Td drug, which is regulated in the National Calendar of preventive vaccinations, will have a favorable effect on the epidemic situation with pertussis infection in Russia.

Key words: pertussis, acellular pertussis vaccine, safety of pertussis vaccine, revaccination against pertussis, immunity to pertussis.

Коклюш — острое инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Bordetella pertussis*, распространяющееся воздушно-капельным путем и характеризующееся судорожным приступообразным кашлем и высокой степенью летальности у детей.

Заболееваемость коклюшем среди детей

Вакцинация детей против коклюша, начатая еще в 1959–1960 гг. во всем мире, в том числе и в нашей стране, обусловила снижение уровня заболеваемости и смертности от данной инфекции. Это также способствовало изменению тяжести клинического течения коклюшной инфекции. Но в то же время у детей с сопутствующей неврологической патологией вакцинация в ряде случаев приводила к ухудшению состоянию здоровья или сопровождалась развитием необычных реакций, поскольку у коклюшного компонента, входящего в состав АКДС препарата, сохранялись нейротропные свойства. Следствием этого стала волна отказа родителей от вакцинации, и в 1980–1990 гг. вновь отмечен резкий рост заболеваемости. Расширения противопоказаний, а также соблюдение индивидуального подхода к профилактическим прививкам, активная иммунизация детей про-

должилась и в современной России. В 2002 г. вновь удалось добиться уменьшения показателей заболеваемости коклюшем. Для удержания уровня заболеваемости на спорадическом уровне (3,0–5,0 на 100 тыс. населения) необходимо поддерживать охват вакцинацией и ревакцинацией не менее 95% от всего населения, подлежащего иммунизации против коклюша в декретированные сроки [2]. Этот уровень был достигнут в начале 2000-х гг., когда заболеваемость среди населения составила менее 5,0 на 100 тыс. населения. В 2005 г. при охвате в 97% прививками детей до 12 месяцев заболеваемость снизилась до 3,2 на 100 тыс. населения [12]. Однако в 2009 г. наметилась новая тенденция, и в 2010 г. заболеваемость коклюшем возросла на 18,5% и составила 3,38 на 100 тыс. населения (2009 г. — 2,87 на 100 тыс. населения) [20]. На 2016 г. показатель заболеваемости составил 5,62 на 100 тыс. населения, что выше уровня заболеваемости 2015 г. на 27,15% (2015 г. — 4,4 на 100 тыс. населения) [14]. При этом среди выявленных случаев заболевания отмечался рост доли привитых детей, в частности детей дошкольного и школьного возраста. Например, с 2009 по 2015 гг. заболеваемость детей до 14 лет возросла в среднем на 40%. Увеличение охвата вакцинации привело со временем к перераспределению числа заболевших коклюшем в возрастных катего-

риях детей до 17 лет. Если рассматривать число заболевших коклюшем в группе детей первых лет жизни, то максимальные показатели заболеваемости отмечаются у детей до 1 года, как правило, не привитых или не закончивших курс вакцинации. В то же время у детей 3–6 лет показатели заболеваемости коклюшем минимальны, по-видимому, за счет иммунитета, сформированного вакцинацией. Однако абсолютное число случаев коклюша наиболее высоко в группе детей 7–14 лет. Это отчетливо видно при рассмотрении долей заболевших детей до 17 лет. Большинство заболевших в 2014 г. составили школьники 7–14 лет — 37,96%, дети до 1 года — 25,0%, дети 3–6 лет — 18,17%, дети в возрасте 1–2 лет — 15,28%. То есть более половины случаев коклюша (56,13%) было зафиксировано у детей в возрасте от 3 до 14 лет [12].

Но стоит учитывать, что данные показатели заболеваемости не отражают реальную ситуацию по коклюшу. Присутствует явная погрешность, связанная с неправильным диагностированием заболевания. Величину недоучета заболеваемости можно оценить, сопоставив общероссийские данные с данными Санкт-Петербурга, где проводится лабораторная верификация диагноза у $\frac{3}{4}$ зарегистрированных больных [у половины из них — при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР)]. Показатели заболеваемости устойчиво расходятся в 3–5 раз, и установлено, что на самом деле диагностируется только 1–36% от всех случаев заболеваемости коклюшем. Например, за 2011 г. заболеваемость в Санкт-Петербурге составила 15,8 на 100 тыс. населения, а в среднем по России — 3,3 на 100 тыс. населения [22]. Остальные случаи не выявляются по причине атипичных форм болезни, неполной сообщаемости, ограниченности методов лабораторной диагностики, не обращения за медицинской помощью, широкой вариабельности клинической картины, недостаточной осведомленности врачей и т. д. [37]. Так, согласно исследованиям, которые проводились с участием детей дошкольного и школьного возраста (средний возраст составлял $9,1 \pm 2,7$ года), у которых сохранялся кашель на протяжении двух недель при отсутствии признаков ОРИ или имелся приступообразный кашель с шумным вдохом в конце приступа или с рвотой без видимых причин, были получены следующие результаты. При проведении ПЦР диагноз коклюшной инфекции был выявлен у 22 из 109 (20,2%) детей, а при использовании реакции агглютинации болезнь обнаружена еще у 12 детей. При этом 102 из 109 пациентов (93,6%) своевременно получили полный комплекс прививок против коклюша (четыре введения АКДС), а 7 пациентов — только 3 прививки. При помощи ПЦР в реальном времени проводилось определение ДНК

B. pertussis, а у детей, у которых кашель длился более месяца, дополнительно определяли титры антител в реакции агглютинации. Таким образом, у 34 из 109 длительно кашляющих детей (31,2%) диагностирован коклюш, в то время как на амбулаторном этапе по клинико-anamnestическим данным подозрение на эту инфекцию только было у 15 детей (13,7%) [8].

Аналогичные результаты были получены при исследовании пациентов 5–16 лет на уровне первичного звена медицинской помощи в Англии. Диагноз коклюшной инфекции был выявлен у 64 из 172 обследованных (37,2%), причем 55 детей из этих 64 (85,9%) были полностью привиты против коклюша по возрасту (3 дозы цельноклеточной коклюшной вакцины на первом году жизни) [40].

Эти исследования свидетельствуют еще и о том, что подавляющее большинство заболевших в дошкольном и школьном возрасте детей проходили полный курс вакцинации против коклюшной инфекции. При этом показано, что вакцина действительно эффективна. Так, по результатам исследования заболеваемости коклюшем привитых и непривитых детей до 2 лет, в которое были включены 63 ребенка 6–11 месяцев (272,4 на 100 тыс. детей данного возраста), 74 ребенка 1 года (172,1 на 100 тыс. детей данного возраста) и 57 детей 2 лет (142,8 на 100 тыс. детей данного возраста), было выявлено, что у привитых детей до 2 лет заболеваемость в 50–100 раз ниже, чем у непривитых [8]. Это означает, что вакцинация, проводимая в первые годы жизни, формирует иммунитет и защищает детей на определенное время, но впоследствии восприимчивость к инфекции возрастает, и наблюдается повышение заболеваемости коклюшем у детей дошкольного и школьного возраста. Например, цельноклеточная коклюшная вакцина, которая применяется в России, дает иммунитет на 4–14 лет, бесклеточная коклюшная вакцина — на 3–10 лет, а натуральная инфекция — на 4–20 лет [59]. Все это свидетельствует о том, что для снижения уровня заболеваемости детей необходима их ревакцинация в возрасте 6–7 лет.

Клиническое течение болезни, осложнения

Типичные формы болезни включают в себя 4 последовательных периода: инкубационный период (от 3 до 14 дней), продромальный (катаральный) период (от 3 до 14 дней), период спазматического кашля (от 2–3 до 6–8 недель и более) и период ранней (от 2 до 8 недель) и поздней (от 2 недель до 6 месяцев) реконвалесценции.

Протекание болезни в тяжелой и среднетяжелой форме чаще всего наблюдается у детей

в возрасте до 1 года. Причем среди детей этого возраста тяжелые формы заболевания в большинстве случаев протекают у непривитых больных. У детей до 1 года болезнь характеризуется укороченным или полностью отсутствующим катаральным периодом, наличием повторных апноэ, рвоты, судорог, более продолжительным периодом спазматического кашля, наблюдаются частые осложнения, среди которых преобладают пневмонии и дисбиозы кишечника.

В ходе анализа болезни среди 267 больных коклюшем детей старше 1 года у пациентов 4–6 лет наблюдались как среднетяжелые формы коклюша, имевшие место у $40,0 \pm 21,9 - 85,7 \pm 9,4\%$, так и легкие формы — $14,3 \pm 9,4 - 60,0 \pm 21,9\%$. Среди детей более старшего возраста (7–14 лет) среднетяжелые и легкие формы болезни были диагностированы практически с одинаковой частотой, составляя $37,0 \pm 9,3 - 61,9 \pm 7,6$ и $38,1 \pm 8,8 - 63,0 \pm 9,3\%$ соответственно. При этом было установлено, что влияние возраста прежде всего выражалось в большей длительности продромального периода по сравнению с детьми в возрасте до 1 года. Так, у большинства детей ($68,8 \pm 2,8\%$) длительность продромального периода составляла 7–14 дней. Кроме того, клиническая симптоматика продромального периода у детей старше 1 года была более выражена [18]. При этом коклюш у детей среднего и старшего возраста и взрослых может протекать серьезнее, чем у детей от 1 до 3 лет. Кашель у первых, в отличие от детей раннего возраста, имеет отчетливую динамику нарастания и носит упорный характер. Его наличие в течение ≥ 3 недель наблюдается у 97%, а ≥ 9 недель — у 52%. Пароксизмы кашля в течение ≥ 3 недель имеют место у 73% больных, репризы — у 69%, посткашлевой рвоты — у 65%, апноэ — 87% [29].

Изменение иммунной реактивности больных коклюшем детей способствует частому развитию у них микст-инфекции, что, прежде всего, обуславливает осложненное наглядное течение заболевания. Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются наиболее частыми из сопутствующих коклюшу инфекционных заболеваний, удельный вес таких больных составляет $40,8 - 73,9\%$. Общими свойствами для таких типов микст-инфекций коклюша с ОРВИ являются увеличение частоты и тяжести приступообразного кашля, высокий риск возникновения бронхолегочных заболеваний и соответствующее увеличение срока выздоровления [17, 18, 58].

Другое частое сопутствующее заболевание при коклюше — респираторный микоплазмоз, который наблюдается у $14,0 - 32,4\%$ больных. Клинические варианты сочетания данной инфекции с коклюшем различаются в зависимости от возраста больного. Если у детей до 3 лет

чаще отмечаются изменения со стороны бронхолегочной системы, то у детей старшего возраста сочетанное развитие коклюша и респираторного микоплазмоза затрагивает верхние дыхательные пути [18].

Наибольшую опасность при коклюше представляет персистенция герпесвирусной инфекции, среди которой чаще проявляется реактивация цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ), оказывающей существенное влияние на тяжесть заболевания и на исход болезни. Именно ассоциация ЦМВ с коклюшем служит основной причиной летального исхода у детей, переходя в генерализованные формы с полиорганными поражениями [15].

Как видно, коклюшная инфекция у детей дошкольного и школьного возраста представляет собой такую же опасность, как и у детей раннего возраста, поэтому следует тщательно рассмотреть вопрос ревакцинации как детей в возрасте 6–7 лет, так и в других возрастных группах для снижения риска возникновения инфекции.

Цельноклеточная и бесклеточная вакцина против коклюша

Вакцинация против коклюша в мире осуществляется совместно с вакциной против дифтерии и столбняка в составе АКДС препарата. Самая первая такая вакцина была выпущена в США в 1914 г. и стала доступной для использования при массовой вакцинации в 1948 г. Это была цельноклеточная противокклюшная вакцина, ассоциированная с вакциной против столбняка и дифтерии (АцКДС). При производстве коклюшного компонента токсина инактивировались умеренным нагреванием с последующим хранением при низких температурах с использованием в качестве консервантов мертиолята, который является производным ртути, или формалина [36]. Затем к практически готовой вакцине добавлялись столбнячные и дифтерийные анатоксины, получая АцКДС препарат. Дальнейшие исследования показали, что использование этой вакцины позволило снизить заболеваемость коклюшем от 70 до 90% [49].

Однако цельноклеточная вакцина имела свои недостатки: при ее производстве токсины инактивируются не полностью, в первую очередь, — эндотоксин и коклюшный токсин, поэтому вакцина в ряде случаев обладает реактогенным свойством. Из-за этого может довольно часто наблюдаться развитие реакций: от обычной локальной гиперемии кожи и отека мягких тканей в месте введения, до довольно редких, но серьезных поражений, включая неврологические заболевания, такие как энцефалопатия, судороги, апноэ [29]. По этим причинам была разработана бесклеточная вакцина против

коклюша — АаКДС. Такие вакцины содержат 1 или более очищенный антиген: коклюшный токсин (КТ), филаментозный геммаглютинин (ФГА), пертактин (ПРН) и фимбрии (ФИМ) типов 2 и 3. Вакцины подразделяются по числу компонентов — 1 (только КТ), 2 (КТ и ФГА), 3 (КТ, ФГА и ПРН) или 5 (КТ, ФГА, ПРН и ФИМ типов 2 и 3), а также по типу бактериального клона, методам очистки и детоксикации, адьювантам и используемым консервантам (тиомерсал и феноксиэтанол). Количество коклюшного антигена, а также дифтерийного и столбнячного компонентов варьируется в разных продуктах и не имеет какого-либо стандарта среди разных производителей [38, 41]. Испытания такой вакцины показали, что она превосходит по эффективности цельноклеточные аналоги, а по безопасности является менее токсичной [35]. Так, при изучении влияния двух- и пятикомпонентной коклюшной вакцины в составе АаКДС препарата и АцКДС среди примерно 10 тыс. детей была показана эффективность и безопасность бесклеточной вакцины. Показатель эффективности, связанный с фиксированием признаков коклюша у детей лабораторным путем в среднем в течение 2 лет после вакцинации, для двухкомпонентной коклюшной вакцины в составе АаКДС был определен на уровне 59%, для пятикомпонентной — 85%, а для АцКДС — 48%. При этом уровень местных реакций (покраснение более 2 см, болезненность) и системных нежелательных явлений (температура более 38°C, плач больше 1 часа, слабость, цианоз) были значительно выше после любой дозы вакцины АцКДС, чем после АаКДС вакцин [39]. Хотя бесклеточные вакцины в России применяются бессистемно и чаще всего индивидуально, на практике накоплен достаточный опыт, позволяющий подтвердить их безопасность [9, 11, 14, 21].

Бесклеточная вакцина также позволяет прививать детей, которым вакцинация АцКДС либо противопоказана (прогрессирующие заболевания ЦНС, афебрильные судороги), либо должна проводиться с осторожностью, например, детям с гидроцефалией, детским церебральным параличом и другими органическими поражениями ЦНС, пороками развития, хроническими патологиями. В некоторых случаях использование бесклеточной вакцины позволяет продолжить вакцинацию против коклюша в случаях возникновения поствакцинальных нежелательных явлений или при чрезмерно сильных системных реакциях на введение АцКДС [1, 3, 4, 5, 23].

Хотя на сегодняшний день бесклеточная противокклюшная вакцина включена в Национальные календари прививок многих зарубежных стран, включая США, Канаду,

Австралию, Европейский союз, некоторые страны Азии, цельноклеточная вакцина до сих пор остается основой профилактики коклюша в мире [42, 52, 57]. Тем не менее, на протяжении последних 30 лет наблюдается повышение уровня заболеваемости коклюшем, а также зарегистрирован ряд вспышек в странах с высоким уровнем вакцинирования детей. Кроме того, как отмечалось ранее, происходит эпидемиологический сдвиг, приведший к перераспределению числа заболевших коклюшем в возрастных категориях детей [12]. Как полагают, ряд факторов может объяснить такие явления. В первую очередь, это уменьшение уровня охвата вакцинации среди подростков и взрослых, постепенное снижение иммунитета после получения бесклеточной коклюшной вакцины, совершенствование методов диагностики и наблюдения, увеличение уровня осведомленности среди населения. Также стоит отметить и саму эволюцию бактерии *B. pertussis*. В последние десятилетия наблюдается распространение возбудителя коклюша с новыми, более вирулентными генотипами. Такие бактерии содержат мутации в генах основных факторов вирулентности и обозначены как «новые», невакцинные генотипы. Вакцина против таких штаммов не всегда эффективна [45, 48, 60]. Некоторые специалисты предполагают, что относительно короткая продолжительность иммунитета к коклюшу, получаемая с бесклеточной вакциной, является основной причиной повышения заболеваемости у детей 7–10 лет, так как цельноклеточная вакцина дает иммунитет на более продолжительный срок [33, 59]. Однако это предположение вызывает сомнение, поскольку заболеваемость в России, где вакцинация детей первых лет жизни осуществляется в основном цельноклеточной коклюшной вакциной, имеет такую же тенденцию.

АаКДС вакцина против коклюша для подростков и взрослых

Даже высокий уровень вакцинации детей раннего возраста не дает свести заболеваемость коклюшем к минимуму из-за постепенного снижения иммунитета к 7–10 годам [59]. В свою очередь, такие люди с пониженным иммунитетом к коклюшу становятся носителями инфекции, и как было показано, 80% случаев заболевания коклюшем происходило за счет заражения от старших членов семьи, которые прошли полный курс вакцинации [30]. Это еще раз подчеркивает важность введения бустерной дозы вакцины детям дошкольного, школьного возраста и взрослым. В этих целях была разработана другая бесклеточная коклюшная вакцина АаКДС, нацеленная на более старшую груп-

пу населения, где концентрация дифтерийного и столбнячного анатоксинов существенно ниже, чем при первичной вакцинации и ревакцинации детей раннего возраста: дифтерийный анатоксин (2 Lf — более 2 МЕ), столбнячный анатоксин (5 Lf — более 20 МЕ) и 5 бесклеточных коклюшных компонентов, КТ — 2,5 мкг, ФГА — 5 мкг и ПРН — 3 мкг; ФИМ типов 2 и 3 — 5 мкг.

Данная вакцина, как и стандартная АаКДС, рекомендованная для детей раннего возраста, показывает высокий уровень безопасности и иммуногенности [45]. В ходе исследования, которое затрагивало 802 человека от 18 до 55 лет, получивших полный курс вакцинации против дифтерии, столбняка и коклюша в детские годы, была проведена ревакцинация моновалентной коклюшной вакциной в составе АаКДС препарата. Антитела к коклюшному токсину через один месяц после вакцинации были установлены у 92% участников исследования [56]. Аналогичные исследования среди подростков от 11 до 18 лет выявили схожие показатели — у 89% участников зафиксированы антитела к коклюшному токсину на 29–49 сут после ревакцинации [46]. В настоящее время ведутся исследования по эффективности данной вакцины, но пока специалисты пришли к выводу, что ревакцинация АаКДС вакциной должна быть начата с 9 лет и проходить каждые 5–10 лет, а в случае вспышек заболеваемости — каждые 2–3 года [26].

Такая вакцина против коклюша с уменьшенным содержанием дифтерийного и столбнячного анатоксинов уже применяется в ряде стран, например, в США, где ревакцинация проводится в 11–12 лет [25].

Применяемые бесклеточные вакцины против коклюша

На сегодняшний день в мире применяются как бесклеточные, так и цельноклеточные вакцины, с преобладанием последних. В развитых странах, таких как США, в Национальный календарь прививок включены только бесклеточные вакцины. Среди них выделяют 5 препаратов, которые прошли проверку и рекомендованы к применению у детей различного возраста. Их основное отличие заключается в разном составе и количестве антигенов. Помимо самих коклюшных компонентов, такие препараты содержат дифтерийные и столбнячные анатоксины [46]. Можно выделить монокомпонентную вакцину Цертива (Certiva, Baxter Laboratories), которая содержит только КТ, двухкомпонентную Трипедию (Tripedia, Sanofi Pasteur) с КТ и ФГА и трехкомпонентную вакцину Инфанрикс (Infanrix, GlaxoSmithKline) с КА,

ФГА и ПРН. Также существует пятикомпонентная вакцина Даптацел (Daptacel, Sanofi Pasteur), содержащая КА, ФГА, ПРН, ФИМ 2-го и 3-го типов [34, 35, 45].

В настоящее время в РФ разработана особая технология получения бесклеточной коклюшной вакцины, которая существенно отличается от технологии получения зарубежных аналогов. Экстракты, полученные с помощью дезоксихолата натрия, характеризуются выраженными протективными свойствами. При разработке технологии получения бесклеточной вакцины используются не менее трех штаммов *B. pertussis* различных серовариантов для каждой серии препарата, аналогичных цельноклеточной вакцине. Таким образом, технология получения отечественной бесклеточной вакцины позволяет получать препараты с антигенной структурой, идентичной цельноклеточной вакцине, с практически полным исключением липополисахаридов, которые определяют истинную реактогенность коклюшного компонента. Опытный отечественный образец бесклеточной вакцины по антигенному репертуару не уступает цельноклеточному аналогу и содержит весь набор протективных антигенов, что выгодно отличает его от известных зарубежных вакцин и в перспективе может широко применяться для массовой дополнительной ревакцинации детей школьного возраста и взрослых [24]. В настоящее время препарат проходит клинические исследования.

Коклюшная вакцина в составе АаКДС препарата с уменьшенным содержанием дифтерийного и столбнячного анатоксинов в США представлена, в основном, двумя препаратами — Адасель (Adacel, Sanofi Pasteur) и Бустрикс (Boostrix, GlaxoSmithKline). Адасель — это пятикомпонентная бесклеточная коклюшная вакцина, которая применяется в США для ревакцинации детей и взрослых от 11 до 64 лет. Данный препарат может использоваться и как альтернатива пятой дозе АКДС вакцины для детей 4–6 лет [35, 50]. Следует отметить, что указанная вакцина прошла регистрацию в России в 2016 г. Бустрикс — это трехкомпонентная бесклеточная вакцина, которая применяется для ревакцинации людей с 10 лет и старше [35, 51].

Эффект от ревакцинации в зарубежных странах

Согласно национальному календарю прививок, вакцинацию против коклюша в России проводят в несколько этапов. Первую, вторую и третью вакцинацию против коклюша проводят в составе 3 доз прививки АцКДС, начиная в возрасте 3 месяцев и перерывом в 4–6 недель между введениями доз. Ревакцинацию осу-

шествляют через год, когда ребенку исполняется 18 месяцев. Последующие ревакцинации против коклюша с использованием бесклеточных вакцин проводятся по желанию, так как они не включены в Национальный календарь прививок [6, 7].

Если рассматривать опыт зарубежных стран, то можно отметить, что вакцинация против коклюша проводится по похожей схеме, с той разницей, что обязательная ревакцинация осуществляется не только до двух лет жизни ребенка, но и после. Около 30 стран зоны Европейского союза проводят повторную ревакцинацию детей в возрасте 6–7 лет, а также и в более старшем возрасте [52].

Рассматривая 10-летние наблюдения, имевшие место в Швеции, связанные с изучением уровня заболеваемости коклюшем до и после введения бустерной бесклеточной дозы вакцины, проводимой детям в возрасте 5–7 лет, можно отметить влияние повторной ревакцинации на общий уровень заболеваемости коклюшем. Бустерная бесклеточная вакцина стала обязательной в 2005 г. после добавления ее в Национальный календарь. До этого времени дети получали 3 дозы бесклеточной вакцины в 3,5 и 12 месяцев. В 2005 г. была инициирована повторная вакцинация детей, родившихся после 1995 г., бесклеточной противокклюшной вакциной. А в 2006 г. было решено, что дети, рожденные после 2002 г., будут получать 4 дозы вакцины в 5–7 лет и 5 дозу — в 14–16 лет. В ходе дальнейшего сравнения заболеваемости коклюшем в периоды 1986–1995 гг. (до внедрения ревакцинации в дошкольные и школьные годы) и 1997–2007 гг. (после внедрения ревакцинации) было выявлено, что в когортах, родившихся после внедрения ревакцинации в 1996 г., возрастные уровни заболеваемости коклюшем были намного меньше, чем в соответствующих возрастных группах до внедрения ревакцинации. Самая большая разница проявляется у детей дошкольного и школьного возраста. Уровень заболеваемости у таких детей снизился с > 1000 на 100 тыс. до 100 человек на 100 тыс. в 1998–2000 гг. и до 20 человек на 100 тыс. в 2003 г. [28]. Если сравнивать эти показатели с Россией, то можно посчитать, что уровень заболеваемости в нашей стране у детей данного возраста выше в 5–7 раз [8].

Примечательны исследования, проводимые в Германии. В связи с исторической подоплекой, обязательная вакцинация детей против коклюша началась в объединенной Германии в 1991 г. При этом через некоторое время было рекомендовано проведение бустерной дозы вакцины в дошкольном возрасте. Но несмотря на высокие показатели охвата вакцинацией среди детей дошкольного возраста, количество случаев заражения коклюшем продолжало ра-

сти в четырех бывших федеральных землях ГДР, которые не вводили ревакцинацию детей дошкольного возраста вплоть до 2006 г. Однако в Саксонии, которая ввела ревакцинацию детей в этом возрасте в 1998 г., показатели заболеваемости оказались в 2–4 раза ниже. Самые высокие показатели заболеваемости отмечались у детей от 5 до 14 лет и достигали > 300 случаев на 100 тыс. населения, тогда как в Саксонии этот показатель составлял максимум 100 случаев на 100 тыс. населения [42].

Повторная ревакцинация детей проводится также и в США. Согласно национальному календарю прививок, первые 5 доз вводятся до 7 лет в 2, 4, 6, 15–18 месяцев и 4–6 лет. Дополнительную бустерную дозу дети получают в 11–12 лет. Все шесть доз являются бесклеточными вакцинами [25, 27].

Вакцининдуцированный иммунитет к коклюшу

В последние 15–20 лет была показана исключительная роль клеточного иммунитета в иммунном ответе у всех типов коклюшных вакцин [32, 44]. Причем иммуногенность вакцины зависит от ее типа. Так, при введении цельноклеточной вакцины иммунный ответ протекает при участии Toll-подобного рецептора 4 типа (TLR4), ассоциированного с CD4-позитивными Т-хелперами 1 типа (Th1) и IL-17 продуцирующими Т-хелперами (Th17). Если же рассматривать бесклеточную вакцину, то иммунный ответ осуществляется CD4-позитивными Т-хелперами 2-го типа (Th2) и Th1 клетками в меньшей мере [44]. Было установлено, что оптимальная защита от коклюша обеспечивается Th1/Th17 клеточным ответом, а не Th1/Th2 ответом [53]. Это может объяснять тот факт, что бесклеточная вакцина имеет меньшую длительность защиты в отличие от цельноклеточной. К тому же показано, что введение цельноклеточной коклюшной вакцины в отличие от бесклеточной приводит только к кратковременному повышению уровня общего IgE и специфических IgE к компонентам вакцины, что особенно важно при вакцинации детей с аллергически измененной реактивностью [10]. Четвертая или пятая бустерная доза бесклеточной вакцины значительно усиливает реакции, обусловленные Th2 клетками, и выработку IgE, что приводит к развитию местных реакций в области инъекции, включая гиперемию кожи и отека и инфильтрата мягких тканей [54, 55]. Однако бесклеточная вакцина индуцирует мощный гуморальный ответ в отличие от цельноклеточной [47]. Но при данном типе ответа происходит довольно быстрое снижение специфического иммунитета и длительности его сохранения. Так,

при обследовании детей 5–7 лет у 53,8% из них был выявлен низкий уровень противокклюш-ных антител уже через 3 года после ревакцинации в 18 месяцев и старше. Спустя 3,5–4 года после ревакцинации количество детей с низким уровнем антител возросло до 72,2%, а через 5 лет их число увеличилось до 74,3%. Анализ общего уровня коллективного иммунитета среди детей 5–7 лет, вне зависимости от срока проведения ревакцинации, позволил установить, что к этому возрасту 67,2% из них полностью утратили поствакцинальный противокклюшный иммунитет. Через 5 лет после ревакцинации у детей 8–10 лет низкий уровень антител наблюдался в 66,7% случаев, а через 6 лет — в 56,2% случаев. Полученная картина с уменьшением количества детей с низким уровнем антител к коклюшу после 5 лет ревакцинации свидетельствуют о том, что дети к этому времени уже успели перенести инфекцию [19].

Исследования, проведенные в Нидерландах, показывают повышение уровня антител после введения бустерной дозы вакцины в дошкольном возрасте. Дополнительная доза в возрасте 4–5 лет была добавлена в Национальный календарь в 2001 г. после подтверждения данных о том, что уровень антител к коклюшным токсинам существенно падает к этому возрасту. Была исследована иммуногенность как бесклеточной, так и цельноклеточной коклюшной вакцины. При этом отмечается, что после бустерной дозы бесклеточной вакцины уровень антител к КТ был выше условного защитного уровня (20 EU/ml) у всех обследуемых, что доказывает появление устойчивого иммунитета у этой группы населения [43].

Заключение

Массовая вакцинация противокклюшными препаратами привела к значительному снижению заболеваемости и смертности от коклюша во всем мире. Однако использование современных коклюшных вакцин послужило причиной появления новых тенденций, а именно: роста нетипичных форм коклюша, увеличения заболеваемости среди подростков и взрослых вследствие непродолжительного иммунитета после вакцинации бесклеточными

препаратами, распространения более вирулентных бактерий *B. pertussis* с антигенными мутациями, позволяющими возбудителю уходить от поствакцинального иммунитета. Объяснить столь высокие показатели заболеваемости в последние годы может и то, что для диагностики заболевания все чаще используются более современные методы обнаружения возбудителя [16]. Так, было установлено, что в России диагностируется лишь 1–36% от всех случаев заболеваемости коклюшем [37].

Наиболее эффективным методом снижения уровня заболеваемости детей в России в настоящее время является введение дополнительной дозы ревакцинации в возрасте 6–7 лет. Ревакцинацию следует проводить с помощью бесклеточной вакцины, которая показала высокую иммуногенность и, в то же время, пониженную частоту развития необычных явлений. Ее также можно использовать при вакцинации детей, которым противопоказано введение АКДС препарата с цельноклеточным коклюшным компонентом. Это в свою очередь может способствовать снижению заболеваемости в других возрастных группах, так как дети являются основными источниками инфекции в семье. Стоит еще учитывать и всю тяжесть протекания коклюшной инфекции у детей дошкольного возраста, которая представляет такую же опасность, что и у детей более раннего возраста.

В этом плане показателен опыт зарубежных стран, где в Национальный календарь прививок введена ревакцинация детей в возрасте от 5 до 7 лет. Например, заболеваемость коклюшем детей дошкольного возраста в Швеции после введения ревакцинации в возрасте 5–7 лет, снизилась в 50 раз к 2003 г. В Германии после введения бустерной дозы противокклюшной вакцины в 1998 г. в ряде областей показатель заболеваемости у детей дошкольного возраста оказался ниже в 2–4 раза, чем в областях, где ревакцинация не вводилась. В связи с этим можно предположить, что замена АДС-М анатоксином, регламентированного в Национальном календаре профилактических прививок, у детей в возрасте 6–7 лет на АаКДС препарат будет способствовать значительному изменению эпидемической ситуации по коклюшной инфекции в России.

Список литературы/References

1. Аллергология и иммунология: национальное руководство. Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 656 с. [Allergologiya i immunologiya: natsional'noe rukovodstvo. Pod red. R.M. Khaitov, N.I. Ilyina]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 656 p.]
2. Басов А.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. Результаты изучения специфического иммунитета к коклюшу у детей разного возраста // Евразийский союз ученых. 2014. № 5. С. 66–68. [Basov A.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G. Results of the study about specific immunity to pertussis in children of different ages. *EvrAzijskii soyuz uchenykh = Eurasian Union of Scientists*, 2014, no. 5, pp. 66–68. (In Russ.)]

3. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: практическое руководство для врачей. 1-е изд. Под ред. М.П. Костинова. М.: Медицина для всех, 1996. 78 с. [Vaktsinatsiya detey s narushennym sostoyaniyem zdorov'ya: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachey. 1-e izd. Pod red. M.P. Kostinova [Vaccination of children with weak health. Practical manual for doctors. 1st edition. Ed. M.P. Kostinov]. Moscow: *Medicine for everybody*, 1996. 78 p.]
4. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: практическое руководство для врачей. 2-е изд. Под ред. М.П. Костинова. М.: Медицина для всех, 2000. 120 с. [Vaktsinatsiya detey s narushennym sostoyaniyem zdorov'ya: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachey. 2-e izd. Pod red. M.P. Kostinova [Vaccination of children with weak health. Practical manual for doctors. 2nd edition. Ed. M.P. Kostinov]. Moscow: *Medicine for everybody*, 2000. 120 p.]
5. Вакцинация детей с нарушенным состоянием здоровья: практическое руководство для врачей. 4-е изд. Под ред. М.П. Костинова. М.: Медицина для всех, 2013. 432 с. [Vaktsinatsiya detey s narushennym sostoyaniyem zdorov'ya: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachey. 4-e izd. Pod red. M.P. Kostinova [Vaccination of children with weak health. Practical manual for doctors. 4th edition. Ed. M.P. Kostinov]. Moscow: *Medicine for everybody*, 2013. 432 p.]
6. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. Краткое изд. Под ред. В.В. Зверева, Р.М. Хайтова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 640 с. [Vaktsiny i vaktsinatsiya: natsional'noe rukovodstvo. Kratkoe izd. Pod red. V.V. Zverev, R.M. Khaitov]. Moscow: *GEOTAR-Media*, 2014. 640 p.]
7. Вакцины нового поколения в профилактике инфекционных заболеваний. 2-е изд, доп. Под ред. М.П. Костинова, В.Ф. Лаврова. М.: МДВ, 2010. 192 с. [Vaktsiny novogo pokoleniya v profilaktike infektsionnykh zabolevaniy. 2-e izd, dop. Pod red. M.P. Kostinova, V.F. Lavrova]. Moscow: *MDV*, 2010. 192 p.]
8. Йозефович О.В., Харит С.М., Каплина С.П., Гостев В.В., Сидоренко С.В., Калиногорская О.С., Кветная А.С., Тимофеева Е.В., Окунева М.А. Распространенность коклюша у длительно кашляющих детей 6–17 лет, привитых в раннем возрасте АКДС-вакциной // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 5. С. 56–59. [Yosefovich O.V., Kharit S.M., Kaplina S.P., Gostev V.V., Sidorenko S.V., Kalinogorskaya O.S., Kvetnaya A.S., Timofeeva E.V., Okuneva M.A. The prevalence of pertussis in long-term coughing children 6–17 years old, vaccinated at an early age with DTP vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2012, no. 5, pp. 56–59. (In Russ.)]
9. Клинико-иммунологическая эффективность иммунобиологических препаратов: справочник. Под ред. М.П. Костинова, Н.А. Озерецковского. М.: Миклош, 2004. 256 с. [Kliniko-immunologicheskaya effektivnost' immunobiologicheskikh preparatov: spravochnik. Pod red. M.P. Kostinova, N.A. Ozeretskovskogo]. Moscow: *Miklosh*, 2004. 256 p.]
10. Костинов М.П., Гервазиева В.Б., Балаболкин И.И., Ботвиньева В.В., Овсянникова И.Г., Федорова О.Е. Гуморальный иммунитет в процессе вакцинации против дифтерии и столбняка детей с аллергическими заболеваниями // Иммунология. 1991. Т. 12, № 5. С. 56–59 [Kostinov M.P., Gervazieva V.B., Balabolkin I.I., Botvineva V.V., Ovsyannikova I.G., Fedorova O.E. Humoral immunity during vaccination of children with allergic diseases against diphtheria and tetanus. *Immunologiya = Immunology*, 1991, vol. 12, no. 5, pp. 56–59.]
11. Новое в клинике, диагностике и вакцинопрофилактике управляемых инфекций. Под ред. М.П. Костинова. М.: Медицина для всех, 1997. 110 с. [Novoye v klinike, diagnostike i vaktsinoprofilaktike upravlyayemykh infektsiy. Pod red. M.P. Kostinova [New in clinics, diagnostics and vaccine prevention governed infection. Ed. M.P. Kostinov]. Moscow: *Medicine for everybody*, 1997. 110 p.]
12. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2015. 206 с. [About the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2014: State report. Moscow: *Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare*, 2015. 206 p.]
13. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2016 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2017. 220 с. [About the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2016: State report. Moscow: *Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare*, 2017. 220 p.]
14. Петина О.А., Большакова Л.Н., Лешкевич И.А., Костинов М.П. Оценка безопасности вакцинации детей комбинированными препаратами, содержащими цельноклеточную или бесклеточную коклюшную вакцину // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015. № 3. С. 44–49. [Petina O.A., Bolshakova L.N., Leshkevich I.A., M.P. Kostinov. Evaluation of the safety of children's vaccination with combined preparations containing whole-cell or acellular pertussis vaccine. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*, 2015, no. 3, pp. 44–49. (In Russ.)]
15. Петрова М.С., Соколова М.В., Попова О.П., Вартанян Р.В., Бондарева Л.Н., Келли Е.Н. Коклюш и цитомегаловирусная инфекция у детей // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2008. № 5. С. 57–60. [Petrova M.S., Sokolova M.V., Popova O.P., Vartanyan R.V., Bondareva L.N., Kelly E.N. Pertussis and cytomegalovirus infection among children. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2008, no. 5, pp. 57–60. (In Russ.)]
16. Пименова А.С., Борисова О.Ю., Цвиркун О.В., Басов А.А., Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Донских Е.Е., Пикина А.П., Кафарская Л.И., Афанасьев М.С., Караулов А.В. Эффективность применения молекулярно-генетической диагностики при обследовании очагов коклюшной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 2. С. 162–170. [Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Tsvirkun O.V., Basov A.A., Aleshkin V.A., Afanasyev S.S., Donskikh E.E., Pikina A.P., Kafarskaia L.I., Afanasyev M.S., Karaulov A.V. Effectiveness of molecular-genetic diagnostics during pertussis infection foci examination. *Infektsiya i иммунитет = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 162–170. doi: 10.15789/2220-7619-2017-2-162-170 (In Russ.)]
17. Попова О.П. Особенности сочетанного течения коклюша и острых респираторных вирусных инфекций у детей // Детские инфекции. 2011. № 3. С. 18–20. [Popova O.P. Features of combined flow of pertussis and acute respiratory viral infections in children. *Detskie infektsii = Children's Infections*, 2011, no. 3, pp. 18–20. (In Russ.)]

18. Попова О.П., Петрова М.С., Бунин С.В., Персиянцева Е.А. Клинические аспекты эволюции коклюша у детей в современных условиях // Инфекционные болезни. 2017. № 3. С. 33–40. [Popova O.P., Petrova M.S., Bunin S.V., Persiyantseva E.A. Clinical aspects of evolution of pertussis in children under modern conditions. *Infeksionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2017, no. 3, pp. 33–40. (In Russ.)]
19. Селезнева Т.С. Мониторинг иммуноструктуры детского населения к коклюшу в современных условиях // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2009. № 2. С. 45–47. [Selezneva T.S. Monitoring of pediatric population's immunostucture to pertussis under the present conditions. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni = Epidemiology and Infectious Diseases*, 2009, no. 2, pp. 45–47. (In Russ.)]
20. Сенягина Н.Е. Коклюш: современное состояние проблемы // Consilium Medicum. Приложение: Педиатрия. 2012. № 3. С. 39–43. [Senyagina N.E. Pertussis: the current state of the problem. *Consilium Medicum. Prilozhenie: Pediatriya = Consilium Medicum. Supplement: Pediatrics*, 2012, no. 3, pp. 39–43. (In Russ.)]
21. Тарасова А.А., Лукушкина Е.Ф., Костинов М.П., Афраймович М.Г., Баскакова Е.Ю., Квасова М.А., Акимова В.П. Вакцинопрофилактика: уч.-метод. пособие. Н. Новгород: Издательский салон И.П. Гладкова, 2016. 103 с. [Tarasova A.A., Lukushkina E.F., Kostinov M.P., Afraymovich M.G., Baskakova E.Yu., Kvasova M.A., Akimova V.P. Vaktzinoprofilaktika: uchebno-metodicheskoye posobiye [Vaccine prevention. Textbook]. *Nizhniy Novgorod: Publishing salon I.P. Gladkova*, 2016. 103 p.]
22. Таточенко В.К. Коклюш — управляемая инфекция // Вопросы современной педиатрии. 2014. Т. 13, № 2. С. 78–82. [Tatochenko V.K. Pertussis — infection not under complete control. *Voprosy sovremennoi pediatrii = Current Pediatrics*, 2014, vol. 13, no. 2, pp. 78–82. doi: 10.15690/vsp.v13i2.975 (In Russ.)]
23. Таточенко В.К., Костинов М.П., Намазова Л.С., Федоров А.М. Эпидемиологические аспекты коклюша в Российской Федерации. Особенности вакцинопрофилактики в современных условиях: пособие для врачей. М., 2006. 38 с. [Tatochenko V.K., Kostinov M.P., Namazova L.S., Fedorov A.M. Epidemiologicheskiye aspekty koklyusha v Rossiyskoy Federatsii. Osobennosti vaktzinoprofilaktiki v sovremennykh usloviyakh: posobie dlya vrachei [Epidemiological aspects of whooping cough in the Russian Federation. Features of vaccine prophylaxis in modern conditions: manual for physicians]. *Moscow*, 2006. 38 p.]
24. Техническое обоснование к «Решению о включении фармацевтической субстанции, неиспользуемой при производстве лекарственных препаратов, в государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации № 20-2-460004/Р/ФС от 24.12.2015/ФГУП «НПО Микроген» Минздрава России [Technical ground to “Decision about including pharmaceutical substation (that isn't used in medicine manufacturing) into State register of medicinal agents” Care of Public Health Ministry of Russian Federation № 20-2-460004/P/FS 24.12.2015]
25. ACIP Childhood/Adolescent Immunization Work Group. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) recommended immunization schedule for persons aged 0 through 18 years. United States — 2013. *MMWR*, 2013, vol. 62, suppl. 1, pp. 2–8.
26. Boyce T.G., Virk A. While waiting for better pertussis vaccines, let's use the ones we have. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 211, no. 7, pp. 1196–1197.
27. Brady M.T., Byington C.L., Davies H.D., Edwards K.M., Jackson M.A., Maldonado Y.A., Murray D.L., Orenstein W.A., Rathore M., Sawyer M., Schutze G.E., Willoughby R.E., Zaoutis T.E. Recommended childhood and adolescent immunization schedule — United States, 2014. *Pediatrics*, 2014, vol. 133, no. 2, pp. 357–363. doi: 10.1093/infdis/jiu591
28. Carlsson R.M., Gustafsson L. Ten year report. Pertussis surveillance in Sweden. Progress report 1 October 1997 – 31 December 2007. *Smittskyddsinstutets rapportserie*, 2008, no. 4.
29. Cody C.L., Baraff L.J., Cherry J.D., Marcy S.M., Manclark C.R. Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics*, 1981, vol. 68, no. 5, pp. 650–660.
30. Crowcroft N.S., Stein C., Duclos P., Birmingham M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet. Infect. Dis.*, 2003, vol. 3, no. 7, pp. 413–418. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00669-8
31. De Serres G., Shadmani R., Duval B., Boulianne N., Déry P., Douville Fradet M., Rochette L., Halperin S.A. Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 182, no. 1, pp. 174–179. doi: 10.1086/315648
32. Edwards K.M. Review of the laboratory approaches to the detection of antibody and cell-mediated immunity to pertussis disease and vaccine. *Expert. Rev. Vaccines*, 2014, vol. 13, no. 10, pp. 1183–1190. doi:10.1586/14760584.2014.946015
33. Edwards K.M. Unraveling the challenges of pertussis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2014, vol. 111, no. 2, pp. 575–576. doi: 10.1073/pnas.1321360111
34. Edwards K.M., Berbers G.A. Immune responses to pertussis vaccines and disease. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 209, suppl. 1, pp. 10–15. doi: 10.1093/infdis/jit560
35. Edwards K.M., Decker M.D. Pertussis vaccines. Vaccines, 6th ed. Eds. Plotkin S.A., Orenstein W., Offit P.A. *Elsevier Saunders*, 2013, pp. 447–492.
36. Geier D., Geier M. The true story of pertrussis vaccination: a sordid legacy? *J. Hist. Med. Allied Sci.*, 2002, vol. 57, no. 3, pp. 249–284.
37. Global Pertrussis Initiative. *Epidemiology*.
38. Guris D., Strebel P.M., Jafari H., Wharton M., Hadler S.C. Pertussis vaccination: use of acellular pertussis vaccines among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.*, 1997, vol. 46, pp. 1–25
39. Gustafsson L., Hallander H.O., Olin P., Reizenstein E., Storsaeter J. A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 1996, no. 334, pp. 349–355. doi: 10.1056/NEJM199602083340602
40. Harnden A., Grant C., Harrison T., Perera R., Brueggemann A.B., Mayon-White R., Mant D. Whooping cough in school age children with persistent cough: prospective cohort study in primary care. *BMJ*, 2006, no. 333, pp. 174–177. doi: 10.1136/bmj.38870.655405.AE
41. Hegerle N., Guiso N. Epidemiology of whooping cough and typing of Bordetella pertussis: report. *Future Microbiol.*, 2013, vol. 8, no. 11, pp. 1391–1403. doi: 10.2217/fmb.13.111
42. Hellenbrand W., Beier D., Jensen E., Littmann M., Meyer C., Oppermann H., Wirsing von König C.H., Reiter S. The epidemiology of pertussis in Germany: past and present. *BMC Infect. Dis.*, 2009, vol. 9: 22. doi: 10.1186/1471-2334-922

43. Hendriks L.H., Berbers G.A., Veenhoven R.H., Sanders E.A., Buisman A.M. IgG responses after booster vaccination with different pertussis vaccines in Dutch children 4 years of age: effect of vaccine antigen content. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 47, pp. 6530–6536. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.052
44. Higgins S.C., Jarnicki A.G., Lavelle E.C., Mills K.H. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells. *J. Immunol.*, 2006, vol. 177, no. 11, pp. 7980–7989. doi: 10.4049/jimmunol.177.11.7980
45. Kilgore P.E., Salim A.M., Zervos M.J., Schmitt H.-J. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2016, vol. 29, pp. 449–486. doi: 10.1128/CMR.00083-15
46. Knuf M., Zepp F., Meyer C., Grzegowski E., Wolter J., Riffelmann M., Wirsing von König C.H. Immunogenicity of a single dose of reduced-antigen acellular pertussis vaccine in a non-vaccinated adolescent population. *Vaccine*, 2006, vol. 24, pp. 2043–2048. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.11.024
47. Mills K.H., Ryan M., Ryan E., Mahon B.P. A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against Bordetella pertussis. *Infect. Immun.*, 1998, vol. 66, no. 2, pp. 594–602.
48. Mooi F.R., Van Der Maas N.A., De Melker H.E. Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation — two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.*, 2014, vol. 142, pp. 685–694. doi: 10.1017/S0950268813000071
49. Prevention of Whooping-cough by Vaccination: Medical Research Council Investigation. *Br. Med. J.*, 1951, vol. 1, pp. 1463–1471. doi:10.1136/bmj.1.4721.1463
50. Product monograph. Adacel.
51. Product monograph. BOOSTRIX.
52. Recommended immunisations for pertussis in EU countries. Vaccine Schedule. *European Centre for Disease Prevention and Control*.
53. Ross P.J., Sutton C.E., Higgins S., Allen A.C., Walsh K., Misiak A., Lavelle E.C., McLoughlin R.M., Mills K.H. Relative contribution of Th1 and Th17 cells in adaptive immunity to Bordetella pertussis: towards the rational design of an improved acellular pertussis vaccine. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, no. 4: e1003264. doi: 10.1371/journal.ppat.1003264
54. Ryan E.J., Nilsson L., Kjellman N., Gothefors L., Mills K.H. Booster immunization of children with an acellular pertussis vaccine enhances Th2 cytokine production and serum IgE responses against pertussis toxin but not against common allergens. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, vol. 121, no. 2, pp. 193–200. doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01306.x
55. Skowronski D.M., Remple V.P., Macnabb J., Pielak K., Patrick D.M., Halperin S.A., Scheifele D. Injection-site reactions to booster doses of acellular pertussis vaccine: rate, severity, and anticipated impact. *Pediatrics*, 2003, vol. 112, no. 6, pt. 1, p. e453
56. Thierry-Carstensen B., Jordan K., Uhling H.H., Dalby T., Sørensen C., Jensen A.M., Heilmann C. A randomised, double-blind, noninferiority clinical trial on the safety and immunogenicity of a tetanus, diphtheria and monocomponent acellular pertussis (Tdap) vaccine in and monocomponent acellular pertussis (Tdap) vaccine in comparison to a tetanus and diphtheria (Td) vaccine when given as booster vaccinations to healthy adults. *Vaccine*, 2012, vol. 30, pp. 5464–5471. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.073
57. Vashishtha V.M., Choudhury P., Kalra A., Bose A., Thacker N., Yewale V.N., et al. Indian Academy of Pediatrics (IAP) Recommended Immunization Schedule for Children Aged 0 through 18 years — India, 2014 and Updates on Immunization. *Indian Pediatr.*, 2014, vol. 51, pp. 785–800.
58. Versteegh F.G., Mooi-Kokenberg E.A., Schellekens J.F., Roord J.J. Bordetella pertussis and mixed infections. *Minerva Pediatr.*, 2006, vol. 58, no. 2, pp. 131–137.
59. Wendelboe A.M., Van Rie A., Salmaso S., Englund J.A. Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2005, vol. 24, no. 5, pp. 58–61. doi: 10.1097/01.inf.0000160914.59160.41
60. Witt M.A., Katz P.H., Witt D.J. Unexpectedly limited durability of immunity following acellular pertussis vaccination in preadolescents in a North American outbreak. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, vol. 54, pp. 1730–1735. doi: 10.1093/cid/cis287

Авторы:

Костинов А.М., студент 1-го года магистратуры биологического факультета ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Костинов М.П., д.м.н., профессор, зав. лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; профессор кафедры эпидемиологии ИПО Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Kostinov A.M., Student of the 1st Year of the Master's Degree, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Vaccination and Immunotherapy of Allergic Diseases, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation; Professor of the Department of Epidemiology of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 23.07.2017
Отправлена на доработку 15.01.2018
Принята к печати 16.07.2018

Received 23.07.2017
Revision received 15.01.2018
Accepted 16.07.2018

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ — ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЗАМЕНА ТРАДИЦИОННЫМ АНТИБИОТИКАМ

Х.Г. Мусин

ФГБОУ ВО Башкирский государственный университет, г. Уфа, Россия

Резюме. Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой гетерогенную группу молекул, участвующих во врожденном и приобретенном иммунном ответе различных организмов, начиная с прокариот и заканчивая млекопитающими, включая человека. Они состоят из 12–50 аминокислотных остатков, обладают разными физико-химическими и биологическими свойствами. Наиболее общим признаком является их способность разрушать клеточную мембрану прокариот, вызывая тем самым гибель клеток. АМП встраиваются в целевые бактериальные клетки и, изменяя свою конформацию, образуют структуры в некоторых случаях напоминающие каналы. Некоторые другие молекулы АМП могут прикрепляться к поверхности бактериальной клетки и образовывать участки повышенной концентрации, при достижении критического числа которых они действуют подобно моющим средствам. Кроме того, будучи заряженными положительно, молекулы таких пептидов, проникая сквозь мембраны паразитарных и бактериальных клеток связываются с полианионными молекулами РНК и ДНК. В число преимуществ АМП входит их высокая метаболическая активность, низкая вероятность возникновения привыкания и побочных эффектов. Кроме того, бактериальным патогенам, ранее не имевшим устойчивости к каким-либо АМП, тяжело выработать стратегию борьбы с ними. В связи с чем, АМП являются наиболее перспективными молекулами-заменителями традиционных антибиотиков. В статье обсуждаются подходы и стратегии терапевтического использования, выработанные за последние годы изучения антимикробных пептидов; описываются наиболее часто встречающиеся механизмы взаимодействия антимикробных пептидов и бактериальной мембраны, физико-химические свойства молекул пептидов; обобщаются результаты исследований по выявлению резистентности некоторых штаммов бактерий к антимикробным пептидам и антибиотикам в целом.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, иммунитет, лекарства нового поколения, дефензины, кателицидины, устойчивость к антибиотикам.

ANTIMICROBIAL PEPTIDES — A POTENTIAL REPLACEMENT FOR TRADITIONAL ANTIBIOTICS

Musin Kh.G.

Bashkir State University, Ufa, Russian Federation

Abstract. Antimicrobial peptides are a heterogeneous group of molecules involved in the innate and acquired immune response of various organisms, ranging from prokaryotes to mammals, including humans. They consist of 12–50 amino acid residues; have different physico-chemical and biological properties. The most common feature is their ability to destroy the prokaryotic cell membrane, which causes cell death. In the action, the molecules of antimicrobial peptides are

Адрес для переписки:

Мусин Халит Галеевич
450076, Россия, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32,
Башкирский государственный университет.
Тел.: 8 961 359-73-89 (моб.).
E-mail: lu2666@yandex.ru

Contacts:

Khalit G. Musin
450076, Russian Federation, Ufa, Zaki Validi str., 32,
Bashkir State University.
Phone: +7 961 359-73-89 (mob.).
E-mail: lu2666@yandex.ru

Библиографическое описание:

Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды — потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 295–308. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308

Citation:

Musin Kh.G. Antimicrobial peptides — a potential replacement for traditional antibiotics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 295–308. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308

embedded in the target bacteriological cells and change their conformation, forming structures in some cases resembling channels. Some other molecules of antimicrobial peptides can cover the surface of a bacteriological cell and form a carpet, when they reach a critical mass they act like detergents. In addition, being positively charged molecules of such peptides, penetrating through the membranes of parasitic and bacteriological cells, bind to polyanionic RNA and DNA molecules. Among the benefits of antimicrobial peptides is their high metabolic activity, low probability of occurrence of addictions and side effects. In addition, bacteriological pathogens that previously did not have resistance to any antimicrobial peptide are difficult to develop a strategy to control them. In this connection, these peptides are the most promising molecules-substitutes for traditional antibiotics. The article discusses the approaches and strategies of therapeutic use, the studies of antimicrobial peptides identified in recent years; The most frequently encountered mechanisms of interaction of antimicrobial peptides and a bacteriological membrane are described, the physicochemical properties of peptide molecules are described; the results of studies on the detection of resistance of some strains of bacteria to antimicrobial peptides and antibiotics in general are summarized.

Key words: antimicrobial peptides, innovative drugs, immunopathology, defensins; cathelicidins; antibiotics resistance.

Введение

Болезнетворные микробы, устойчивые к традиционным антибиотикам, являются серьезной проблемой современного здравоохранения. По некоторым данным, более 70% всех известных болезнетворных бактерий устойчивы как минимум к одному из наиболее часто используемых антибиотиков. Потому существует необходимость внедрения новых препаратов и терапевтических подходов, которые позволят преодолеть устойчивость патогенов. Антимикробные пептиды (АМП) являются наиболее привлекательным решением данной проблемы, поскольку являются продуктами длительной эволюции. Возрастающий интерес к АМП подготовил огромный пласт теоретических знаний для развития фармакологических технологий и приемов для производства новейших антибиотиков. У АМП есть целый ряд свойств, которыми не обладает ни один обычный антибиотик. Они сочетают в себе противомикробную, ангиогенную и противовоспалительную активность с иммуномодулирующим. Однако есть несколько аспектов которые задерживают производство препаратов на основе АМП: дороговизна расходных материалов, недостаточная изученность физико-химических и биологических свойств, нестабильность продукта или его токсичность для собственных клеток организма. Целью данной обзорной статьи является обобщение последних данных о пептидах с антимикробной активностью.

Краткая история открытия АМП

Центральную роль белков во всей биологии осознали к концу первой четверти XX в., и с тех пор ни у кого не вызывает сомнения, что все жизненные процессы протекают с участием этих универсальных «молекул жизни». Первые белки описали еще в XVIII в. — это альбумин (яичный белок), фибрин (один из белков крови)

и глютен (запасающий белок пшеницы). Наряду с возрастающим интересом к белковым молекулам, предпринимались попытки понять из чего состоят подобные сложные вещества. В смесях, получавшихся при гидролизе белков находили отдельные аминокислоты. К 1900 г. их было обнаружено всего 13 [6], все остальное называли пептонами, свойства которых ни исследовать, ни описать не представлялось возможным [1].

В 1900 г. Э. Фишер предположил, что белки являются полимерами аминокислот, соединенных пептидной связью. В доказательство этому он разработал обширную комплексную программу исследования белков. И важное место в ней занимал именно синтез аминокислот и пептидов, то есть их искусственное получение, сохраняющее не только структуру, но и все свойства [27]. Сотрудниками Э. Фишера было получено огромное число аминокислотных последовательностей, свойства и функции которых они пытались описать. Некоторые успешные эксперименты говорили о том, что полученные искусственным путем пептидные последовательности сохраняют биологическую активность и ничем не уступают природным [3]. Вместе с тем, велась работа по изучению роли коротких аминокислотных последовательностей в организме человека и животных, так как пептидам традиционно отводилась роль в эндокринной регуляции [43, 45].

Пептид — это термин, обозначающий молекулу, состоящую из двух и более аминокислот, которые соединены между собой пептидной связью. Пептиды, состоящие из менее чем 10–15 аминокислотных остатков называют олигопептидами, более 10–15 — полипептидами. Белками принято называть последовательности, в составе которых имеется более 50 аминокислотных остатков. Изначально пептиды, выделенные из гемолимфы насекомых, кожных секретов амфибий и фагоцитов млекопитающих, обратили на себя внимание благодаря способности подавлять рост различных микро-

организмов [40]. Механизмы действия антимикробных веществ лейкоцитов было инициировано фагоцитарной теорией иммунитета, выдвинутой в 1883 г. И.И. Мечниковым [49], суть которой заключалась в следующем. В организме существует большое число фагоцитов, захватывающих, изолирующих и уничтожающих чужеродные тела. Это позволяет организму не только устранить угрозу, но и «изучить» чужеродное тело и выработать стратегию борьбы с ним. После очередного введения патогена организм уже знает как бороться с ним и действует по отработанной схеме. Позже Мечников сформулировал концепцию о цитазах — бактерицидных соединениях ферментативной природы. Гипотетические цитазы имели лейкоцитарное происхождение, могли захватывать и переваривать захваченные микроорганизмы. Однако следующие исследования показали, что антимикробные соединения лейкоцитов не обладают ферментативным действием [21].

Последующий импульс изучение антимикробных пептидов получило после открытия лизосом. 1949–1951 гг. биохимик, Кристиан Де Дюв [22], изучавший действие инсулина в клетках печени крыс, случайно обнаруживает различие в активности кислых фосфатаз в зависимости от способа выделения. Вначале он подумал, что произошла некая техническая ошибка. Однако последующие эксперименты только подтверждали результат. Тогда Де Дюв предположил, что внутри клеток имеются маленькие частички, облаченные в мембрану, которые разрушаются в ходе эксперимента. Сейчас известно, что лизосомы присутствуют практически во всех клетках, в том числе и в лейкоцитах гранулоцитарного ряда [44]. В 1963 г. американские исследователи Н.И. Зеуа и J.K. Spitznagel выделили из гранул нейтрофилов морской свинки группу полипептидов с молекулярной массой менее 10 kDa, которые проявляли антимикробные свойства [7]. Эти вещества в последующем будут названы дефензинами (англ. «defense» — защита).

Цекропин является первым пептидом с антимикробным действием, выделенным из покоящихся куколок *Hyalophora cecropia* в 1981 г. Хансом Боманом и его коллегами [60]. Цекропины Бомана подавляли рост и развитие широкого спектра микробных организмов, но практически не влияли на небактериальные клетки. Это открытие частично объясняло то, каким именно образом насекомым удается преодолеть инфекции, не имея Т-клеток, В-клеток, которыми обладает система адаптивной иммунной защиты высших животных. Именно Боман впервые доказал причастность АМП к системе врожденного и приобретенного иммунного ответа [60]. Ускоренный рост устойчивости

патогенных микроорганизмов к антибиотикам явился еще одним стимулом для поиска более эффективных противомикробных препаратов. В те же годы доктор Роберт Лерер предположил, что в организмах млекопитающих так же имеются АМП. Спустя четыре года он обнаружил их упакованными в клетках нейтрофилов. В его лаборатории впервые были расшифрованы первичные структуры дефензинов кролика, морской свинки, крысы и человека [30].

В 1986 г. еще одно примечательное открытие было сделано Майклом Заслоффом. Изучая работу генов на больших и прозрачных икринках шпорцевых лягушек (*Xenopus laevis*), он заметил, что раны лягушек, прооперированных в нестерильных условиях, прекрасно заживали даже в грязной воде. Заслофф был убежден, что в слизистой лягушек есть мощный АМП, наподобие цекропинов Бомана или дефензинов Лерера. В течение последующих нескольких месяцев были выделены и описаны магаинины [88]. После этого открытия интерес к АМП внезапно возрос, и к 2001 г. число описанных пептидов с антибактериальным действием достигло отметки 500 последовательностей.

На сегодняшний день известно, что пептидные последовательности состоят из аминокислотных остатков, соединенных между собой пептидными (амидными) связями [57]. Среди множества пептидных последовательностей, особое внимание привлекают катионные пептиды, свойства, структуры, механизмы действия и перспективы использования которых изложены ниже.

Общая характеристика, свойства и структура АМП

Жизнь многоклеточных организмов во все времена протекала в среде обитания множества патогенов. Система врожденного иммунитета животных обеспечивает немедленную защиту организма в ответ на внедрение патогена благодаря большому числу молекулярных факторов, реализующих рекогносцировочные и эффекторные механизмы ее функционирования. Наряду с множеством белковых факторов врожденного иммунитета, таких как компоненты системы комплемента, лизоцим, лактоферрин, цитокины и др., особую роль в защите организма от инфекций играют эндогенные антимикробные пептиды, продуцируемые позвоночными [28] и беспозвоночными [23] животными, растениями [72], грибами и бактериями. В отличие от многих классических антибиотиков, являющихся продуктами вторичного метаболизма, подавляющее большинство АМП синтезируются непосредственно на рибосомах.

Таблица 1. Обзор некоторых антимикробных пептидов растений и животных

Table 1. Review of some antimicrobial peptides of plants and animals

Антимикробный пептид Antimicrobial peptid	Источник Origin	Активность Activity	Литература Reference
Цекропин А Cecropin A	<i>Hyalophora cecropia</i>	Г+, Г-, АВ, АП, ПО G+, G-, AV, AP, AT	[38, 66]
Цекропин Б Cecropine B	<i>Hyalophora cecropia</i>	Г+, Г- G+, G-	[76, 83]
Магаинин 1 Magainin 1	<i>Xenopus laevis</i>	Г+, Г- G+, G-	[48, 88]
Магаинин 2 Magainin 2	<i>Xenopus laevis</i>	Г+, Г-, АВ, АП, ПО, ПГ, АМ, РЗ, способен разрушать сперматозоиды G+, G-, AV, AP, AT, AF, AM, WH, destroys sperm cells	[88, 90]
Пирхорицин Pyrrhoricin	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Г+, Г- G+, G-	[68]
Писцидин Piscidin (Of-Pis1)	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Г+, Г-, ПГ, АП G+, G-, AF, AP	[73]
Тахистатин А2 Tachystatin A2	<i>Limulus polyphemus</i>	Г+, Г-, ПГ G+, G-, AF	[55]
Апидацин Apidacin	<i>Apis mellifera</i>	Г-, МИО G-, IRM	[14, 69]
Овечий кателицидин Cathelicidin SMAP-29	<i>Ovis aries</i>	Г+, Г-, ПГ, ПО, МИО, разрушает некоторые типы клеток млекопитающих G+, G-, AF, AT, IRM, destroys some types of mammalian cells	[46, 71]
Ареницин-3 Arenicin-3	<i>Arenicola marina</i>	Г+, Г-, ПГ G+, G-, AF	[52]
Максимин Maximin H5	<i>Bombina maxima</i>	Г+, АВ G+, AV	[65]
Тионин (Рр-ТН) Thionine (Pp-TH)	<i>Pyricularia pubera</i>	Г+, Г-, ПО, разрушает некоторые типы клеток млекопитающих G+, G-, AT, destroys some types of mammalian cells	[75]
Заячий кателицидин Cathelicidin CAP18	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Г+, Г-, МИО G+, G-, IRM	[41]
Индолицидин Indolicidin	<i>Bos taurus</i>	Г+, Г-, АВ, выраженная токсичность к клеткам млекопитающих, МИО G+, G-, AV, severe toxicity for mammalian cells	[67, 90]
Пептид нейтрофила человека-1 Human neutrophil peptide (HNP-1)	<i>Homo sapiens</i>	Г+, Г-, АВ, АП, ПО, ПГ, АМ, РЗ, МИО, затормаживает активность некоторых энзимов, подавляет токсины патогенов G+, G-, AV, AP, AT, AF, AM, WH, IRM, inhibits the activity of certain enzymes, suppresses toxins of pathogens	[16, 19, 24, 26, 74]
Человеческий кателицидин Human cathelicidin LL37	<i>Homo sapiens</i> <i>Pan troglodytes</i>	Г+, Г-, АВ, АП, ПО, ПГ, АМ, РЗ, МИО, затормаживает активность некоторых энзимов, способен разрушать сперматозоиды, наблюдается слабая токсичность в отношении клеток млекопитающих G+, G-, AV, AP, AT, AF, AM, WH, IRM, inhibits the activity of certain enzymes, destroys sperm cells, a weak toxicity for mammalian cells	[5, 20, 78]

Примечание: Г+ — против грамположительных бактерий, Г- — против грамотрицательных бактерий, АВ — антивирусная, АП — антипаразитарная, ПО — противоопухолевая, ПГ — противогрибковая, АМ — антималярийная, РЗ — ранозаживляющая, МИО — модуляция иммунного ответа.

Note: G+ — against Gram-positive bacteria, G- — against Gram-negative bacteria, AV — antiviral, AP — antiparasitic, AT — antitumor, AF — antifungal, AM — antimalarial, WH — wound healing, IRM — immune response modulation.

Антимикробные пептиды, найденные у микроорганизмов, растений и животных, считаются эволюционно отобранными молекулами врожденного иммунитета [14, 40, 63]. В настоящее время, по структурно-функциональным свойствам описано более 2700 АМП. Разнообразие этих пептидов настолько велико, что их трудно как-либо классифицировать. Самой распространенной является классификация по вторичной структуре изученных белков.

Вторичная структура АМП может быть следующей: α -спиральная (магаинины и цекропины), β -складчатая (дефензины, тионины), линейная (индолицидин, пирхорицин) и β -шпильчатая. α -спираль образуется в результате действия водородных связей внутри молекулы, является правозакрученной. β -складчатость формируется при наличии 2-х или нескольких дисульфидных связей внутри молекулы. β -шпильчатая форма является результатом наличия одной дисульфидной связи. Представляет собой линейную молекулу с одной петлей или циклическую молекулу, если дисульфидная связь образовалась на концах молекулы [57]. В основном, все эти пептиды в свободном растворе не имеют структуры как таковой, а представляют из себя линейный ряд. Свою истинную структуру они принимают лишь при контакте с биологической мембраной. Внутри клеточной мембраны проявляется амфипатичность, в результате которого гидрофобные части молекулы ориентируются к билипидному слою, оставляя гидрофильные части в растворе. Это свойство, зачастую, отвечает за антимикробную активность [34].

Практически все АМП являются катионными молекулами, суммарный заряд которых часто находится в пределах от +2 до +9. Пространственное распределение молекулы основано на принципе разделения составных частей на гидрофобные и гидрофильные участки. По сути они являются амфипатическими молекулами.

В растениях АМП в большом количестве накапливается в семенах. Это обеспечивает защиту покоящихся семян от микробных организмов, которые могут стать причиной инфекционного или грибкового заболевания. Кроме этого, известны АМП, которые накапливаются в корнях или листьях. Многие АМП (тот же пептид Pp-TH), накапливающиеся в семенах и листьях, токсичны для млекопитающих, птиц и рептилий, что предотвращает их поедание. В организме насекомых АМП сосредоточены в гемолимфе [33], у высших животных — в клетках крови: в гранулоцитах и нейтрофилах. Такие АМП как CAP18 и LL37 относятся к одному из наиболее важных классов антимикробных пептидов млекопитаю-

щих — к кателицидинам. Они синтезируются в лейкоцитах, в клетках эпителия и слизистой оболочки. Кроме фагоцитирующих клеток антимикробные пептиды найдены и в железистых структурах. Например, токсины некоторых организмов, такие как ликотоксин, выделенный из паука *Lycosa carolinensis* [84], и пардаксин, выделенный из плавников *Pleuronectes platessa* [10], имеют антибактериальную активность.

АМП имеют широкий спектр действия: антиоксидантное, антигипертензивное, противогрибковое, противовирусное, противоопухолевое (табл. 1). Они также участвуют в модуляции иммунного ответа. Кроме того, имеются АМП, которые не проявляют бактерицидные свойства в условиях *in vitro*. Антибактериальные эффекты таких пептидов обнаруживаются в определенных условиях. Как часто случается, созданные в лаборатории условия не в полной мере отвечают тем условиям, в которых обычно работает тот или иной АМП. Возможно, АМП в естественной среде взаимодействует не только с бактериальной мембраной, но и с собственными молекулами организма.

Большинство АМП синтезируются на рибосомах, однако есть и те пептиды, которые синтезируются на различных биологических поверхностях, преимущественно на многообразных мегаферментах. Такие пептиды называются нерибосомными. Нерибосомные полипептиды не требуют наличия мРНК матрицы, часто имеют циклическую форму и содержат в своем составе непротеиногенные аминокислоты. За одну полипептидную последовательность отвечает один или несколько мегаферментов. Гены, отвечающие за эти синтетазы обычно оформлены в один оперон (у бактерий) или в кластеры (у эукариот). Биосинтез нерибосомных пептидов схож по механизму с биосинтезом жирных кислот [61]. Полимиксин Б [89], бацитрацин [25], ванкомицин [37] являются примерами нерибосомных АМП.

Практически все АМП синтезируются в виде молекул-предшественников, содержащих сигнальные последовательности, определяющих их локализацию в клетке. В процессе так называемого молекулярного созревания молекула-предшественник подвергается ограниченному расщеплению, в результате которого образуется биологически активный пептид [29]. Антимикробные пептиды эволюционировали как универсальный и неотъемлемый компонент иммунной системы против инфекций. В свою очередь бактерии и грибы, которые паразитируют на макроорганизмах, также изменили свои геномы, чтобы противостоять иммунной системе. Таким образом, изучение АМП будет давать нам возможность лучше понимать механизмы действия пепти-

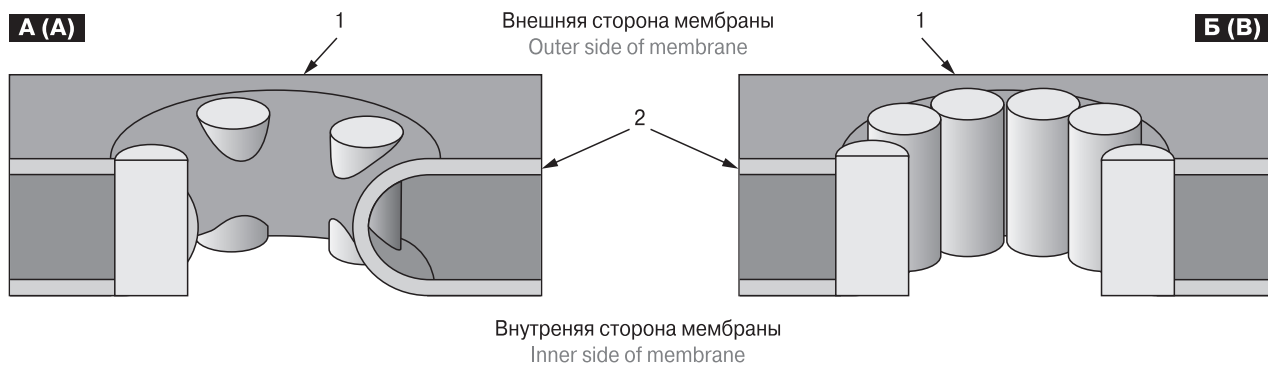


Рисунок 1. Модель тороидального (А) и цилиндрического (Б) типов взаимодействий АМП с клеточной мембраной

Figure 1. Toroidal (A) and cylindrical (B) models of AMP action on cell membrane

1 — молекулы АМП, 2 — липидный бислой.

1 — AMP molecules; 2 — bilipid layer.

дов на бактериальную клетку и, соответственно, разработать синтетические препараты для борьбы с ними.

Механизмы действия АМП

Даже после 30 лет интенсивных исследований АМП нельзя сказать, что найден универсальный принцип их действия. Это происходит не из-за скудности научных исследований, а по причине того, что универсальной модели не существует. Каждая АМП имеет свой уникальный способ взаимодействия с живой системой, причем действие даже одного АМП против различных групп живых организмов может значительно отличаться [8].

Первоначальный контакт между пептидом и целевым организмом является электростатическим, так как большинство бактериальных поверхностей имеют отрицательный заряд или являются гидрофобными. Положительно заряженная пептидная молекула прилипает к отрицательно заряженной мембране бактерий за счет электростатической энергии, и чем выше заряд АМП, тем быстрее протекает этот процесс. Следует сказать, что мембрана прокариот имеет более отрицательный заряд нежели мембрана эукариот, в связи с чем обуславливается первичная избирательность АМП. Амфипатичность, размер и заряд АМП позволяют встроиться на поверхность мембраны с образованием одного из следующих нескольких структур [33] (рис. 1).

Цилиндрическая структура образуется тогда, когда молекулы пептидов плотно примыкают друг к другу и выстилают всю внутреннюю поверхность поры. Тороидальная структура характеризуется тем, что между пептидными молекулами остается небольшая часть, заполненная липидами бислоя. В некоторых исследова-

ниях также выделены полутороидальный тип, который включает свойства и того и другого типа пор. Что именно заставляет АМП образовывать те или иные структуры до конца непонятны [33, 86]. Видимо, здесь играет роль не только физико-химическая, структурная и электростатическая характеристика пептида, но и такие параметры, как плотность билипидного слоя и его состав. В самом деле, многие ученые в последнее время пришли к выводу, что за способность формировать поры отвечают не определенные аминокислотные последовательности, а отдельные аминокислоты. Так, к примеру, даже маленькие последовательности, состоящие из менее чем 15 аминокислотных остатков, обладают выраженным антимикробным действием [80].

Другой тип формирования пептидных пор (рис. 2) называется «ковер» [33, 54]. При ковровом типе пептиды накапливаются на поверхности мембраны, покрывая верхнюю часть, а при достижении критической концентрации начинают действовать как моющие средства, разрушая липидный слой. Еще один механизм действия АМП имеет название «тонущий плот»: пептиды связываются с липидами биологических мембран и погружаются внутрь. В месте проникновения пептида образуется брешь [70]. Некоторые пептиды способны создавать электрический потенциал через липидный бислой, достаточный для образования пор с помощью электропорации [15].

Знание формы пор очень важно, поскольку в большинстве случаев именно от нее зависит стабильность антимикробного эффекта и длительность его действия. Зная механизм действия того или иного АМП, мы можем прогнозировать его действие и эффективность против определенного заболевания. Возникал вопрос о том, как организм минимизирует неблаго-

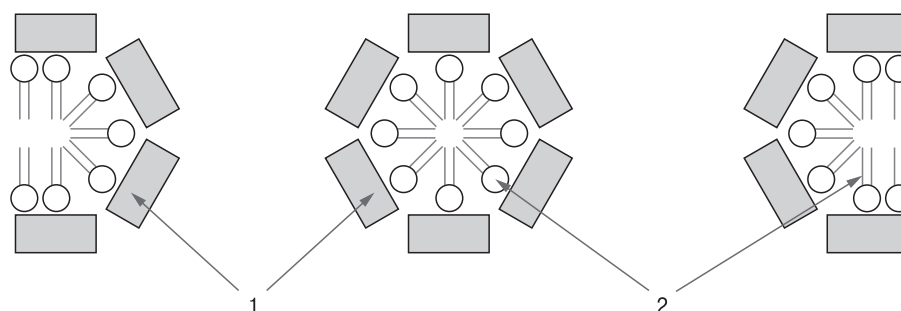


Рисунок 2. Модель коврового типа взаимодействия АМП с клеточной мембраной

Figure 2. Model of carpet-like action of AMP on cell membrane

1 — молекулы АМП, 2 — липидный бислой.

1 — AMP molecules, 2 — bilipid layer.

приятное воздействие катионных пептидов на собственные клетки во время воспаления и фагоцитоза и обеспечивает действие, направленное именно против микроорганизмов. Было выяснено, что такая избирательность обусловлена структурными, а также морфологическими факторами [54, 70]. Стенка клеток микроб-

ных организмов в основном выстроена из кислых фосфолипидов, благодаря чему мембрана приобретает отрицательный заряд. Напротив, мембраны эукариотических клеток состоят из цвиттерионных фосфолипидов. Кроме этого, в фосфолипидном бислое эукариот имеются включения холестерина [33].

Таблица 2. Примеры антимикробных пептидов с иммуномодулирующей активностью

Table 2. Examples of antimicrobial peptides with immunomodulatory activity

Антимикробный пептид Antimicrobial peptid	Локализация экспрессии пептида Localization of peptide expression	Иммуномодулирующий эффект Immunomodulating effect
Человеческий кателицидин LL37 Human cathelicidin LL37	Нейтрофилы, желудочно-кишечный, дыхательный и урогенитальный тракты Neutrophils, gastrointestinal, respiratory and urogenital tracts	Усиливает синтез IgG и активность макрофагов [78], продуцирует противовоспалительный ответ, является хемоаттрактантом для дендритных клеток [20] Enhances the synthesis of IgG and macrophage activity [78], produces an anti-inflammatory response, act as a chemoattractant for dendritic cells [20]
Пептид нейтрофила человека — 1 Human neutrophil peptide (HNP-1)	Нейтрофилы, В-лейкоциты, Т-лейкоциты, скелетная мускулатура, легочный эпителий, желудочно-кишечный тракт Neutrophils, B-leukocytes, T-leukocytes, skeletal musculature, pulmonary epithelium, gastrointestinal tract	Увеличивает активность макрофагов, дезактивирует экзотоксины бактерий, выступает хемоаттрактантом для Т-клеток, моноцитов и тучных клеток, регулирует фактор некроза опухолевых клеток [24] Increases the activity of macrophages, deactivates exotoxins of bacteria, acts as a chemoattractant for T cells, monocytes and mast cells, regulates tumor necrosis factor [24]
Индолицидин Indolicidin	Нейтрофилы, легочный эпителий, В-лейкоциты, Т-лейкоциты Neutrophils, pulmonary epithelium, B-leukocytes, T-leukocytes	Регулирует фактор некроза опухолевых клеток, подавляет пролиферативную активность спленоцитов [67] Regulates tumor necrosis factor, suppresses the proliferative activity of splenocytes [67]
Апидацин Apidacin	Гемолимфа Hemolymph	Продукция молекулы CD80, которая активирует Т-клетки [69] The production of the CD80, which activates T cells [69]

Таким образом, можно говорить о том, что пептиды вызывают гибель бактериальных клеток, образуя непреодолимые дефекты в целевых микробных клеточных мембранах. В связи с этим, пептиды вызывают утечку ионов и метаболитов, что приводит к деполяризации мембраны, остановке трансмембранных связей и синтеза биополимеров, и, в конце концов, к смерти клетки. Описанные механизмы являются основным эффектом действия АМП. Следует отметить, что разрушение клеточной мембраны может быть недостаточным для гибели патогенных микробов. Многие пептиды легко проникают через биологические мембраны. Их антимикробные свойства проявляются уже внутри клетки. Если одни пептиды связываются с отрицательно заряженными молекулами ДНК и РНК [67], другие блокируют активность рибосом [11]. В обоих случаях нарушается синтез белка, и клетка гибнет. К примеру, дефензины, образовав поры в клеточной мембране, проникают внутрь клетки и блокируют систему трансляции нуклеиновых кислот, в связи с чем прекращается синтез белковых молекул [19].

Цитоплазматическая мембрана участвует во многих клеточных процессах. Такие процессы, как селективная проницаемость, поддержание градиента, электронный транспорт, окислительное фосфорилирование, синтез пептидогликанов, хитина и многих других полимеров, происходит непосредственно на цитоплазматической мембране, либо с ее участием. Названные выше клеточные процессы прямо влияют на патогенность бактерий. АМП могут прямо или опосредованно вызывать ингибирование того или иного процесса. Например, доказано [68], что пирхорицин полностью ингибирует активность АТФаз в клетках *E. coli*, чем и вызывает мгновенную гибель бактериальной клетки. Такое мгновенное действие объясняется деполяризацией клеточных мембран, сопровождаемое воздействием пептидов на важные процессы жизнедеятельности клеток, например дыхание.

Существует такое понятие, как молекулярный синергизм, когда отдельно взятые АМП слабо или вовсе не проявляют антимикробные свойства, но при их смешивании противомикробный эффект усиливается в разы. В качестве примера можно привести исследования, проведенные командой Westerhoff H.V. в 1995 г. [81]: 2 пептидные последовательности, magainin 2 и PGLa, выделенные из кожи *Xenopus laevis* действовали вместе в 20 раз сильнее, чем по отдельности. В экспериментах *in vitro* было показано, что комбинация hBD-2 и hBD-4 значительно снижала активность *Pseudomonas aeruginosa* [85]. Так же дефензины человека часто действуют в комплексе, образуя «коктейль» из АМП.

Иммуномодулирующий эффект АМП

АМП могут связываться с мембранными рецепторами клеток и участвовать в иммунном ответе, начиная с воспалительных процессов и заканчивая заживлением ран [53, 56].

Некоторые АМП, такие как пептиды группы кателицидинов и дефензинов, являются аттрактантами для клеток иммунной системы (табл. 2). Они усиливают выработку цитокинов, способствуют высвобождению гистамина из тучных клеток. α -дефензины, а также некоторые β -дефензины человека выступают сигнальной молекулой для моноцитов, Т-клеток и незрелых дендритных клеток. К примеру, продемонстрировано, что дефензины в условиях *in vitro* способны увеличивать адгезию Т-клеток к эпителиоцитам легочного эпителия через индукцию IFN γ , IL-10 и IL-6 [74]. Известно, что α -дефензины, в частности HNP-1, активируют гены синтеза хемокинов СК5В, СК6 и СК7А [26], которые в свою очередь выступают хемоаттрактантами для моноцитов. HNP могут демонстрировать некоторую противоопухолевую активность за счет регулируемого апоптоза опухолевых клеток, а также за счет подавления процессов ангиогенеза [16].

LL37 значительно увеличивает эндоцитотическую активность, регулирует экспрессию генов, которые отвечают за активность Т-хелперов [20]. Есть исследования [85], которые показали, что данный АМП отвечает за образование активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах крови человека во время провоспалительных процессов. Пептид ингибирует апоптотическую активность нейтрофилов путем взаимодействия с P2X7 и рецептором FPRL1, однако активирует вторичный апоптоз. Таким образом, LL37 является модулятором нейтрофилов, индуцируя высвобождение провоспалительных цитокинов TNF α и IL-1 β и активизируя антимикробные свойства [78].

Лактоферрицин, как известно, является частью приобретенного пассивного иммунитета, передаваясь в первые же дни жизни человека от матери к ребенку. Лактоферрицин образуется в желудке в процессе пепсин-опосредованной трансформации лактоферрина [77]. Лактоферрицин подавляет избыточный воспалительный процесс, регулируя уровень выработки АФК. При избыточном производстве активного кислорода, при котором собственные защитные антиоксидантные механизмы клетки не могут справиться с окислительным потенциалом, может произойти некроз ткани [31]. Избыток АФК участвует в развитии немалого числа заболеваний, таких как рак, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [4].

Устойчивость патогенов к антимикробным пептидам

Микробные патогены заселяют разнообразные ткани и органы, где непременно сталкиваются с защитой макроорганизма. Чтобы выжить, в процессе эволюции у таких микроорганизмов постепенно выработались механизмы устойчивости к АМП. Было бы нереалистичным ожидание, будто бы любой АМП может уничтожить любую бактерию. Однако необходимо отметить, что сопротивляемость к АМП довольно редкое явление. Интересно, что бактерии, устойчивые к АМП, имеют большую устойчивость и к стандартным антибиотикам [47].

Молекулярные основы устойчивости к АМП пока не ясны. Тем не менее, имеются некоторые наблюдения, которые могут дать представление о возможных причинах. В некоторый момент времени АМП взаимодействует с клеточной поверхностью целевого патогена. Таким образом, можно предположить, что устойчивые к АМП микроорганизмы имеют слабый отрицательный заряд мембраны, недостаточный для взаимодействия [13]. Такие особенности присущи некоторым представителям рода *Staphylococcus*, клеточные мембраны которых пронизаны положительно заряженными аминогруппами связанными молекулами тейхоевой кислоты, которые понижают отрицательный заряд клеточной стенки [51]. Многие бактериальные и грибковые патогены образуют вокруг себя капсулу [18]. Гликокаликс, из которого состоит большинство подобных капсул, имеет отрицательный заряд. Следовательно, разумно предположить, что гликокаликс препятствует нормальному взаимодействию АМП с клеточной мембраной. Многие бактерии также выделяют протеолитические ферменты, которые, разлагая пептиды, обретают резистентность [82].

Pseudomonas aeruginosa инфицируя ткани нарушает их нормальную физиологию, что приводит к дисфункции ионообменных процессов и соответственно увеличение локального уровня ионов, к нарушению фагоцитарной способности близлежащих тканей, к нарушениям функций переноса ионов Na^+ . Такие трансформации тканей могут вызвать сепсис. Образованная *P. aeruginosa* микросреда подавляет активность АМП и традиционных антибиотиков [32]. Вероятно, ионы, которые присутствуют в среде, мешают нормальному связыванию АМП с бактериальной мембраной. Еще одним механизмом резистентности к АМП является мгновенный индуцированный ответ. Как было недавно показано, некоторые виды бактерий [87] содержат в своем геноме ген синтеза регулона PhoP/PhoQ. Данный регулон

мгновенно модифицирует белки, фосфолипиды и липополисахариды бактериального организма, что снижает губительный эффект АМП.

В заключении можно сказать, что подобно макроорганизмам, которые формируют иммунитет по отношению к тем или иным патогенам, микроорганизмы развивают механизмы защиты от АМП. Однако образование штамма, обладающего устойчивостью к АМП, из штамма, не обладающего таковой, явление крайне редкое.

Синтетические антимикробные пептиды

Перед тем как разрешить использование пептидов в качестве замены стандартным антибиотикам, необходимо полностью исследовать свойства, действие и распад АМП. С этой целью путем систематического изменения уже существующих природных пептидов, замены пептидных последовательностей, с образованием α -спиральных структур были созданы синтетические пептиды. Большинство новых антимикробных соединений было выведено методами комбинаторной химии. Полученные АМП должны быть менее токсичными для животных и растений, иметь ярко выраженную антимикробную активность и быть устойчивыми к пищеварительным ферментам. Модифицируя природные АМП можно повысить антибактериальную активность, и уменьшить токсичность собственным клеткам макроорганизма. Bessalle R. et al. синтезировали ряд пептидов [9] различной длины и гидрофобности, названных моделинами, и обнаружили, что пептидные последовательности длиной 16–17 аминокислотных остатков, богатые триптофаном и фенилаланином, обладали высокой бактерицидной активностью. При замене триптофана или фенилаланина на лейцин бактерицидные свойства резко снижались. Все эти пептиды, как и предполагалось, не имели определенной структуры в воде, однако в гидрофобной среде быстро приобретали α -спиральную структуру.

Корме этого Lim H.S. et al. [42] в белке гранулизине заменили аспарагиновую кислоту на аргинин, а метионин на цистеин. Как показали исследования, вновь синтезированный пептид имел более выраженные антимикробные свойства. Так же при определенных модификациях можно увеличить специфичность, стабильность и снизить токсичность АМП к собственным клеткам. Так, было показано, что при модификации индолицидина, снизилась токсичность его коротких аналогов в отношении эритроцитов крови человека, однако противоопухолевая

активность индолицидина была утрачена [1]. С помощью химических модификаций можно расширить спектр действия АМП. К примеру, грамицидин, полученный из бактериальных клеток, имеет слабую токсичность к грамположительным и грамотрицательным бактериям, тогда как его модифицированный аналог убивает большинство подобных бактерий, к тому же токсичность к клеткам млекопитающих значительно снижена [79].

Имеются данные, что синтезированный *de novo* пептид с последовательностью GILKTIKSIASKVANTVQKLKRKAKNAVA имел противомикробную активность, подавляя рост грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*). Эти пептиды обладали низкой цитотоксичностью к клеткам макроорганизмов [62]. Четыре гибридных АМП, созданных на основе индолицидина и ранеликсина подавляли рост *Streptococcus pneumoniae*. При этом было доказано, что эти пептиды не токсичны по отношению к эритроцитам человека, клеткам печени и легких [36]. Синтетический пептид WALK11 обладает не только антимикробной, но и иммуномодулирующей активностью [64]. Эти и несколько других исследований подтверждают, что *de novo* синтезированные пептиды могут стать перспективными молекулами, заменяющими стандартные антибиотики.

Кроме всего прочего, синтез АМП обременен дороговизной расходных материалов. Более приемлемым решением подобной задачи является компьютерное моделирование. Например, программа DBAASP v2 предоставляет пользователям подробную информацию касательно пептидной последовательности, позволяет модифицировать аминокислотные последовательности и изучить структуру синтезируемого пептида [59]. Подобного рода программы помогают прогнозировать возможные полезные свойства АМП и сокращают расходы уже на стадии проектирования исследований.

Терапевтический потенциал АМП

Для любого антимикробного препарата имеются требования селективности, при которых губительный эффект должен быть направлен именно на патогенные клетки. АМП обладают существенными преимуществами в качестве антибиотиков, которые были обсуждены выше. Кроме этих эффектов, АМП способны нейтрализовать токсины, которые непременно образуются после гибели патогенных клеток [35, 58]. Недавние исследования намного расширили наше понимание механизмов действия АМП, определили новые пути использования противoinфекционных

агентов или стратегии лечения. Наиболее очевидный терапевтический потенциал АМП связан с созданием узкоспециализированных препаратов, ориентированных на определенные микробные субструктуры, на отключение основных механизмов адаптивной сопротивляемости патогенов и факторов вирулентности, характерных для инфекций.

Любой чужеродный микроорганизм, оказавшись в кровеносной системе, начинает адсорбировать различные белки из плазмы крови, которые могут перестроить бактериальную мембрану таким образом, что ее начинают узнавать фагоцитарные клетки. Иммунная система млекопитающих является сложной сетью эффекторных молекул, которые способны распознавать и ликвидировать микробные клетки. При разработке лекарств на основе АМП необходимо учитывать взаимодействие со всеми этими молекулами. Чтобы облегчить задачу и усилить направленность АМП предлагают заключить их в различные капсулы, например в липосомы и мицеллы. Такие наноносители внешне заряжены положительно и будут взаимодействовать только с отрицательно заряженными бактериальными мембранами по принципу электростатического сродства [102]. Кроме того, АМП, заключенные в липидные оболочки защищены от разрушительных действий протеолитических ферментов ЖКТ. Мицеллы и некоторые другие капсулы для пептидов могут взаимодействовать с минералами. Например, в одном исследовании описываются мицеллы с антимикробным агентом, которые способны прикрепляться к зубной эмали и длительное время подавлять рост *Streptococcus mutans* [17]. Жевательная резинка также может выступать в качестве носителя АМП, которые могут ингибировать рост оральных микроорганизмов, вызывающих кариес [50]. Таким образом, заключение АМП в нанокапсулы повышает эффективность АМП, его биодоступность и период действия.

Заключение

Болезнетворные микробы, устойчивые к традиционным антибиотикам, являются актуальной проблемой современного здравоохранения. АМП выступают привлекательной альтернативой традиционным антибиотикам.

Исследования в этой области выявляют все более новые, перспективные АМП, которые можно будет использовать в качестве лекарственных препаратов. По сравнению с традиционными антибиотиками, АМП обладают высокой селективностью, мощным бактерицидным действием и низкой токсичностью к клеткам макроорганизма.

Еще не до конца изучены механизмы действия АМП и устойчивости микроорганизмов к ним. С точки зрения науки, АМП содержит в себе еще много тайн, которые так или иначе будут раскрыты в будущем. Исторически промышленный выпуск пептидов был ограничен особенностями технологий их производства,

сопутствующими высокими расходами и вопросами контроля качества продукта. Эти ограничения сохраняются и по сей день. Тем не менее, развивающаяся наука и всеобщий прогресс и дальше будут стимулировать разработку и поиск новых, эффективных АМП и путей их синтеза.

Список литературы/References

1. Абрамов В.Я. Два великих француза: благодетель человечества Луи Пастер и апостол образования Жан Масэ. СПб.: М. Городецкий, 1897. [Abramov V.Ya. Dva velikih francuza: blagodetel' chelovechestva Lui Paster i apostol obrazovaniya Zhan Maseh [Two great Frenchmen: the benefactor of humanity Louis Pasteur and the apostle of education Jean Mase]. *St. Petersburg: M. Gorodetskii, 1897.*]
2. Артамонов А.Ю., Шанин С.Н., Орлов Д.С., Шамова О.В., Колодкин Н.И., Рыбакина Е.Г. Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов индолицидина и его структурных аналогов // Медицинская иммунология. 2009. Т. 11 (1). С. 101–104. [Artamonov A.Y., Shanin S.N., Orlov D.S., Shamova O.V., Kolodkin N.I., Rybakina E.G. Immunomodulatory activity of antimicrobial peptide indolicidin and its structural analogues. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2009, vol. 11 (1), pp. 101–104. doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-101-104. (In Russ.)*]
3. Abderhalden E., Fodor A. Synthese von hochmolekularen polypeptiden aus glykokoll und l-leucin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1916, vol. 49, iss. 1.*
4. Actor J.K., Hwang S.-A., Kruzel M.L. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des., 2009, vol. 15 (17), pp. 1956–1973.*
5. Alalwani S.M., Sierigk J., Herr Ch., Pinkenburg O., Gallo R., Vogelmeier C., Bals R. The antimicrobial peptide LL-37 modulates the inflammatory and host defense response of human neutrophils. *Eur. J. Immunol., 2010, vol. 40 (4), pp. 1118–1126. doi: 10.1002/eji.200939275*
6. Anfinsen C.B., Edsall J.T., Richards F.M. Advances in protein chemistry. NY: Academic Press, 1972, pp. 99–103.
7. Bagiolini M., de Duve C., Masson P.L., Heremans J.F. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *J. Exp. Med., 1970, vol. 131, no. 3, pp. 559–570.*
8. Bennett W.F., Hong C.K., Wang Y., Tieleman D.P. Antimicrobial peptide simulations and the influence of force field on the free energy for pore formation in lipid bilayers. *J. Chem. Theory Comput., 2016, vol. 12 (9), pp. 4524–4533. doi: 10.1021/acs.jctc.6b00265*
9. Bessalle R., Gorea A., Shalit I., Metzger J.W., Dass C., Desiderio D.M. Structure-function studies of amphiphilic antibacterial peptides. *J. Med. Chem., 1993, vol. 36, pp. 1203–1209.*
10. Bloch-Shilderman E., Jiang H., Lazarovici P. Pardaxin, an ionophore neurotoxin, induces PC12 cell death: activation of stress kinases and production of reactive oxygen species. *J. Nat. Toxins, 2002, vol. 11, pp. 71–85.*
11. Brannan A.M., Whelan W.A., Cole E., Booth V. Differential scanning calorimetry of whole *Escherichia coli* treated with the antimicrobial peptide MSI-78 indicate a multi-hit mechanism with ribosomes as a novel target. *Peer J., 2015. doi: 10.7717/peerj.1516*
12. Carmona-Ribeiro A.M. Interactions between bilayer vesicles, biomolecules, and interfaces. Handbook of surfaces and interfaces of materials; ed. Nalwa H.S. Academic Press; Burlington, VT, USA: 2001, pp. 129–165.
13. Cashman K.A., Bayer A.S., Yeaman M.R. Diversity and susceptibility to antibiotics and cationic peptides among *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium* isolates of diverse clinical or geographic origin. *98th General Meeting for the American Society for Microbiology, 1998, pp. 17–21.*
14. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaecq M., Tempst P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J., 1989, vol. 8 (8), pp. 2387–2391.*
15. Chan D.I., Prenner E.J., Vogel H.J. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta, 2006, vol. 1758 (9), pp. 1184–1202.*
16. Chavakis T., Cines D.B., Rhee J.S. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alphadefensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J., 2004, vol. 18 (11), pp. 1306–1308.*
17. Chen F., Jia Z., Rice K.C., Reinhardt R.A., Bayles K.W., Wang D. The development of dentotropic micelles with biodegradable tooth-binding moieties. *Pharm. Res., 2013, vol. 30 (11), pp. 2808–2817.*
18. Costerton I. Bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol., 1981, vol. 35, pp. 299–324.*
19. Dabirian S., Taslimi Y., Zahedifard F., Gholami E., Doustdari F., Motamedirad M., Khatami S., Azadmanesh K., Nylen S., Rafati S. Human neutrophil peptide-1 (HNP-1): a new anti-leishmanial drug candidate. *PLoS Negl. Trop. Dis., 2013, vol. 7 (10), p. 2491. doi: 10.1371/journal.pntd.0002491*
20. Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., MacDonald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol., 2004, vol. 172 (2), pp. 1146–1156.*
21. De Duve C. From cytochromes to lysosomes. *Fed. Proc. 1964, vol. 23, pp. 1045–1049.*
22. De Duve C. The lysosome turns fifty. *Nat. Cell Biol., 2005, vol. 7, no. 9, pp. 847–849. doi: 10.1038/ncb0905-847*
23. Dhople V., Krukemeyer A., Ramamoorthy A. The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Biomembranes, 2006, vol. 1758 (9), pp. 1499–1512. doi: 10.1016/j.bbame.2006.07.007*
24. Droin N., Hendra J.B., Ducroix P., Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumor molecules. *J. Proteomics, 2009, vol. 72 (6), pp. 918–927. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.002*
25. Economou N.J., Cocklin S., Loll P.J. High-resolution crystal structure reveals molecular details of target recognition by bacitracin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, vol. 110, pp. 14207–14212. doi: 10.1073/pnas.1308268110*

26. Falco A., Brocal I., Pérez L., Coll J.M., Estepa A., Tafalla C. In vivo modulation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response by the human alpha defensin 1, HNP1. *Fish Shellfish Immunol.*, 2008, vol. 24, pp. 102–112.
27. Fischer E. Untersuchungen über Aminosäuren, polypeptide und proteine (1899–1906). *Verlag: Berlin Julius Springer, 1906.*
28. Fischer G. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, vol. 33, pp. 1415–1436.
29. Ganz T. Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp.*, 1994, vol. 186, pp. 62–71.
30. Ganz T., Lehrer R.I. Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.*, 1997, vol. 4 (1), pp. 53–61.
31. Gutteridge J.M. Review Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress, and neurodegeneration. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1994, vol. 738, pp. 201–213.
32. Hachem R.Y., Chemaly R.F., Ahmar C.A., Jiang Y., Boktour M.R., Rjaili G.A., Bodey G.P., Raad I.I. Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in cancer patients. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51 (6), pp. 1905–1911. doi: 10.1128/AAC.01015-06
33. Hancock R.E.W., Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002 vol. 206 (2), pp. 143–149. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11000.x
34. Hancock R.E.W., Sahl H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.*, 2006, vol. 24, pp. 1551–1557. doi: 10.1038/nbt1267
35. Harris M., Mora-Montes H.M., Gow N.A., Coote P.J. Loss of mannosylphosphate from *Candida albicans* cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology*, 2009, vol. 155, pp. 1058–1070.
36. Hassan M.J., Cheng F.L., Mohd Y.M.Y., Rukumani D.V., Vannajan S.L., Sharifuddin M.Z., Diyana M.I., Shamala D.S. Antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from indolicidin and ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One*, 2015, vol. 10 (6).
37. Hofmann C.M., Anderson J.M., Marchant R.E. Targeted delivery of vancomycin to *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a fibrinogen-derived peptide. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2012, vol. 100, pp. 2517–2525.
38. Holak T.A., Engström A., Kraulis P.J., Lindeberg G., Bennich H., Jones T.A., Gronenborn A.M., Clore G.M. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 1988, vol. 27 (20), pp. 7620–7629.
39. Kirienko N.V., Ausubel F.M., Ruvkun G. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112 (6), pp. 1821–1826. doi: 10.1073/pnas.1424954112
40. Kreil G. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview. *Ciba Found Symp.*, 1994, vol. 186, pp. 77–90.
41. Larrick J.W., Hirata M., Shimomoura Y., Yoshida M., Zheng H., Zhong J., Wright S.C. Antimicrobial activity of rabbit CAP18-derived peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, vol. 37 (12), pp. 2534–2539.
42. Lim H.S., Chun S.M., Soung M.G., Kim J., Kim S.J. Antimicrobial efficacy of granulysin-derived synthetic peptides in acne vulgaris. *Int. J. Dermatol.*, 2015, vol. 54 (7), pp. 853–862. doi: 10.1111/ijd.12756
43. Louvet J.-P., Mitchell H.S., Ross G.T. Effects of human chorionic gonadotropin, human interstitial cell stimulating hormone and human follicle-stimulating hormone on ovarian weights in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Endocrinology*, 1975, vol. 96 (5), pp. 1179–1186. doi: 10.1210/endo-96-5-1179
44. Lüllmann-Rauch R. History and morphology of the lysosome. In: *Lysosomes. P. Saftig. Springer US, 2005, pp. 1–16.*
45. MacLennan A.H. The role of the hormone relaxin in human reproduction and pelvic girdle relaxation. *Scand. J. Rheumatol.*, 1991, suppl. 88, pp. 7–15.
46. Mahoney M.M., Lee A.Y., Brezinski-Caliguri D.J., Huttner K.M. Molecular analysis of the sheep cathelin family reveals a novel antimicrobial peptide. *FEBS Letters*, 1995, vol. 377 (3), pp. 519–522.
47. Mantovani H.C., Russell J.B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, pp. 808–813.
48. Matsuzaki K., Harada M., Handa T., Funakoshi S., Fujii N., Yajima H., Miyajima K. Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, vol. 981 (1), pp. 130–134.
49. Metchnikoff E. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1887, vol. 1, p. 321.
50. Na D.H., Faraj J., Capan Y., Leung K.P., DeLuca P.P. Chewing gum of antimicrobial decapeptide (KSL) as a sustained antiplaque agent: preformulation study. *J. Control Release*, 2005, vol. 107, pp. 122–130. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.05.027
51. Nahaie M.R., Goodfellow M., Minnikin D.E., Hajek V. Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1984, vol. 130, pp. 2427–2437.
52. Neve S., Raventós D. NZ17074: an arenicin-3 variant found by HTS screening of yeast libraries. In: *Novozymes A/S. Copenhagen: Adenium Biotech, 2012.*
53. Niyonsaba F., Nagaoka I., Ogawa H., Okumura K. Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, vol. 15 (21), pp. 2393–2413.
54. Oren Z., Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, pp. 451–463. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F
55. Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S. Horseshoe crab hemocyte-derived antimicrobial polypeptides, tachystatins, with sequence similarity to spider neurotoxins. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274 (37), pp. 26172–26178.
56. Otvos L. Jr. Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2016, vol. 19, pp. 1–21. doi: 10.1556/030.63.2016.005
57. Pauling L. The nature of the chemical bond. 3rd ed. *Cornell University Press, 1960.*
58. Peschel A., Sahl H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, vol. 4, pp. 529–536.
59. Pirtskhalava M., Gabrielian A., Cruz P., Griggs H.L., Squires B., Hurt D.E., Grigolava M., Chubinidze M., Gogoladze G., Vishnepolsky B., Alekseyev V., Rosenthal A., Tartakovsky M. DBAASP v.2: an enhanced database of structure and antimicrobial/cytotoxic activity of natural and synthetic peptides. *Nucl. Acids Res.*, 2016, vol. 44 (13). doi: 10.1093/nar/gkw243

60. Pütsep K., Faye I. Hans G. Boman (1924–2008): pioneer in peptide-mediated innate immune defence. *Scand. J. Immunol.*, 2009, vol. 70 (3), pp. 317–326. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02293.x
61. Roongsawang N., Washio K., Morikawa M. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int. J. Mol. Sci.*, 2011, vol. 12 (1), pp. 141–172. doi: 10.3390/ijms12010141
62. Sánchez-Vásquez L., Silva-Sánchez J., Jiménez-Vargas J.M., Rodríguez-Romero A., Muñoz-Garay C., Rodríguez M.C., Gurrrola G.B., Possani L.D. Enhanced antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from vejovine and hadrurin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, vol. 1830 (6), pp. 3427–3436. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.01.028
63. Schneider D. Plant immune responses. *Stanford University Department of Microbiology and Immunology*, 2005. 11 p.
64. Shim D.W., Heo K.H., Kim Y.K., Sim E.J., Kang T.B., Choi J.W., Sim D.W., Cheong S.H., Lee S.H., Bang J.K., Won H.S., Lee K.H. Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of Toll-like receptor 4 Endocytosis in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *PLoS One*, 2015, vol. 10 (5). doi: 10.1371/journal.pone.0126871
65. Storici P., Zanetti M. A novel cDNA sequence encoding a pig leukocyte antimicrobial peptide with a cathelin-like pro-sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, vol. 196 (3), pp. 1363–1368.
66. Strominger J.L. Animal antimicrobial peptides: ancient players in innate immunity. *J. Immunol.*, 2009, vol. 182 (11), pp. 6633–6637. doi: 10.4049/jimmunol.0990038
67. Subbalakshmi C., Sitaram N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, vol. 160, pp. 91–96.
68. Taniguchi M., Ochiai A., Kondo H., Fukuda S., Ishiyama Y., Saitoh E., Kato T., Tanaka T. Pyrrolicorin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. *J. Biosci. Bioeng.*, 2016, vol. 121 (5), pp. 591–598. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.09.002
69. Tavano R., Segal, D., Gobbo M., Papini E. The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. *J. Innate Immun.*, 2011, vol. 3, pp. 614–622.
70. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Curr. Trends Pept. Sci.*, 2005, vol. 80 (6), pp. 717–735. doi: 10.1002/bip.20286
71. Tomasinsig L., Zanetti M. The cathelicidins — structure, function and evolution. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2005, vol. 6 (1), pp. 23–34.
72. Tonk M., Vilcinskas A., Rahnamaeian M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, vol. 100, pp. 7397–7405. doi: 10.1007/s00253-016-7718-y
73. Umasuthan N., Mothishri M.S., Thulasitha W.S., Nam B.H., Lee J. Molecular, genomic, and expression delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pisl peptide. *Fish Shellfish Immunol.*, 2016, vol. 48, pp. 154–168. doi: 10.1016/j.fsi.2015.11.005
74. Van Wetering S., Tjabringa S., Hiemstra P.S. Interaction between neutrophil-delivered antimicrobial peptides and airway epithelial cells. *J. Leuk. Biol.*, 2005, vol. 77, pp. 444–450. doi: 10.11584.8835
75. Vernon L.P., Evett G.E., Zeikus R.D., Gray W.R. A toxic thionin from *Pyrularia pubera*: purification, properties, and amino acid sequence. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, vol. 238, pp. 18–29.
76. Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D., Pechmann N., Ludvigsen A., Neumann M., Holle R., Salmons B., Erfle V., Brack-Werner R. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.*, 1998, vol. 79 (Pt 4), pp. 731–771. doi: 10.1099/0022-1317-79-4-731
77. Wakabayashi H., Takase M., Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, vol. 9 (16), pp. 1277–1287. doi: 10.2174/1381612033454829
78. Wan M., van der Does A.M., Tang X., Lindbom L., Agerberth B., Haeggström J.Z. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 95 (6), pp. 971–981. doi: 10.1189/jlb.0513304
79. Wang F., Qin L., Pace C.J., Wong P., Malonis R., Gao J. Solubilized gramicidin A as potential systemic antibiotics. *Chembiochem.*, 2012, vol. 13 (1), pp. 51–55. doi: 10.1002/cbic.201100671
80. Wang Y., Chen J., Zheng X., Yang X., Ma P., Cai Y., Zhang B., Chen Y. Design of novel analogues of short antimicrobial peptide anoplin with improved antimicrobial activity. *J. Pept. Sci.*, 2014, vol. 20 (12), pp. 945–951. doi: 10.1002/psc.2705
81. Westerhoff H.V., Zasloff M., Rosner J.L., Hendler R.W., De Waal A., Vaz Gomes A., Jongsma P.M., Riethorst A., Juretic D. Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes. *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 228, pp. 257–264.
82. Whitelock J.M., Murdoch A.D., Iozzo R.V., Underwood P.A. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271 (17), pp. 10079–10086. doi:10.1074/jbc.271.17.10079
83. Xu D., Yang W., Hu Y., Luo Z., Li J., Hou Y., Liu Y., Cai K. Surface functionalization of titanium substrates with cecropin B to improve their cytocompatibility and reduce inflammation responses. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, vol. 110, pp. 225–260. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.050
84. Yan L., Adams M.E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, pp. 2059–2066.
85. Yanagi S., Ashitani J., Imai K. Significance of human bdefensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, vol. 13, pp. 63–69.
86. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.*, vol. 81, pp. 1475–1485.
87. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, 2003, vol. 55, pp. 27–55.
88. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84 (15), pp. 5449–5453. doi: 10.1073/pnas.84.15.5449

89. Zavascki A.P., Goldani L.Z., Li J., Nation R.L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2007, vol. 60, pp. 1206–1215. doi: 10.1093/jac/dkm357
90. Zhao H., Mattila J.P., Holopainen J.M., Kinnunen P.K. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81 (5), pp. 2979–2991. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75938-3

Автор:

Мусин Х.Г., аспирант кафедры биохимии и биотехнологии биологического факультета Башкирского государственного университета, г. Уфа, Россия.

Поступила в редакцию 25.10.2017
Отправлена на доработку 18.04.2018
Принята к печати 13.06.2018

Author:

Musin Kh.G., PhD Student, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biology, Bashkir State University, Ufa, Russian Federation.

Received 25.10.2017
Revision received 18.04.2018
Accepted 13.06.2018

МикроРНК И ТУБЕРКУЛЕЗ

В.В. Еремеев, В.В. Евстифеев, Г.С. Шепелькова, А.Э. Эргешова, М.А. Багиров

ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

Резюме. В 2015 г. более десятой части связанных с туберкулезом (ТБ) смертей были обусловлены *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ ТБ) (WHO, 2016). В сочетании с недостаточной приверженностью к режиму лечения, генетическая гетерогенность и клональность штаммов *M. tuberculosis* больного, а также слабая проницаемость туберкулезной гранулемы для противотуберкулезных препаратов (ПТП) способны приводить к снижению эффективности применяемой терапии, что в еще большей степени способствует распространению МЛУ и ШЛУ ТБ. Особое беспокойство вызывает факт быстрого распространения устойчивости к недавно введенным в клиническую практику ПТП второго ряда, предназначенным для лечения МЛУ ТБ — деламаниду и бедаквилину. Таким образом, распространение лекарственной устойчивости к ПТП наряду с ограниченными возможностями химиотерапии у больных МЛУ ТБ и ШЛУ ТБ настоятельно диктуют необходимость дополнения канонической химиотерапии ТБ методами лечения, направленными на хозяина. МикроРНК (miRs) представляют собой короткие последовательности одноцепочечной РНК, которые на посттранскрипционном уровне контролируют до 60% генов, кодирующих синтез белков. Накапливаются данные, указывающие на существенную роль miRs в тонкой настройке реакции организма на инфекцию, в первую очередь за счет модуляции экспрессии белков, вовлеченных в реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Несмотря на то, что установленные на текущий момент проявления активности miRs локализованы внутри клеток, в ряде исследований обнаружены очень стабильные циркулирующие в крови внеклеточные miRs. В настоящее время активно изучается возможность использования этих молекул в качестве биологических маркеров. Течение ТБ характеризуется состоянием длительного хронического воспаления, в ходе которого развивающиеся параллельно или поэтапно регуляторные и провоспалительные процессы влияют на тяжесть и исход заболевания. Как про-, так и противовоспалительные воздействия служат элементами стратегии бактерий в борьбе за выживание в организме хозяина. В нашем обзоре рассматривается роль miRs в качестве маркеров туберкулезной инфекции, характера и прогноза течения заболевания, участие miRs в регуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа на туберкулезную инфекцию, а также дана оценка перспектив клинического применения miRs для диагностики и лечения туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, микроРНК, врожденный иммунный ответ, адаптивный иммунный ответ, биомаркеры.

MICRORNA AND TUBERCULOSIS

Eremeev V.V., Evstifeev V.V., Shepelkova G.S., Ergeshova A.E., Bagirov M.A.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. In 2015, more than 10% of tuberculosis (TB)-related deaths were attributable to *M. tuberculosis* with multiple drug-resistance (MDR-TB) and extensively drug-resistance (XDR-TB) (WHO 2016). In combination with insufficient commitment to the treatment regimen, the genetic heterogeneity and clonality of the patient's *M. tuberculosis*, as well as

Адрес для переписки:

Еремеев Владимир Витальевич
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2,
ФГБНУ «ЦНИИТ».
Тел.: 8 (499) 785-91-59 (служебн.).
E-mail: yermeev56@mail.ru

Contacts:

Vladimir V. Yermeev
107564, Russian Federation, Moscow, Yauzskaya alley, 2,
Central Tuberculosis Research Institute.
Phone: +7 (499) 785-91-59 (office).
E-mail: yermeev56@mail.ru

Библиографическое описание:

Еремеев В.В., Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С., Эргешова А.Э., Багиров М.А. МикроРНК и туберкулез // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 309–315. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-309-315

Citation:

Yermeev V.V., Evstifeev V.V., Shepelkova G.S., Ergeshova A.E., Bagirov M.A. MicroRNA and tuberculosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 309–315. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-309-315

Работа поддержана грантом РФФ № 16-15-10242

the poor permeability of the tuberculosis granuloma for the drug, can lead to monotherapy, despite the use of several drugs, which further promotes the spread of MDR and XDR-TB. Of particular concern is the rapid spread of resistance to newly introduced into clinical practice second-line drugs, intended for the treatment of MDR-TB — delamanid and bedaquiline. Thus, the spread of drug resistance to chemotherapy, along with the limited possibilities of chemotherapy in patients with MDR-TB and XDR-TB, dictate the need to supplement canonical chemotherapy with TB treatment methods directed at the host. MicroRNAs (miRs) are short sequences of single-stranded RNA that control up to 60% of genes encoding protein synthesis at a post-transcriptional level. Accumulating data points to the essential role of miRs in fine tuning the host response to infection, primarily by modulating the expression of proteins involved in the reactions of innate and adaptive immune responses. Despite the fact that the established functions of miRs activity are intracellular, a number of studies have discovered highly stable extracellular miRs circulating in blood. Currently, the possibility of using these molecules as biomarkers is being actively investigated. Chronic TB inflammation is characterized by parallel or step-by-step development of regulatory and pro-inflammatory processes that affect the severity and outcome of the disease. Both pro- and anti-inflammatory effects are elements of the bacterial strategy in the struggle for survival in the host organism. In this review we discuss the role of miRs as markers of tuberculosis infection, the nature and prognosis of the course of the disease, the involvement of miRs in the regulation of the innate and adaptive immunity in tuberculosis infection, and the perspectives for clinical usage of miRs as means for diagnosis and treatment of tuberculosis.

Key words: tuberculosis, microRNA, innate and adaptive immune response, biomarkers.

Введение

По данным ВОЗ, туберкулез (ТБ), развивающийся в результате инфицирования *Mycobacterium tuberculosis*, остается наиболее летальным (1,8 млн смертей в 2015 г.) из инфекционных заболеваний, вызванных единичным патогеном. Модифицируя защитные механизмы хозяина *M. tuberculosis* способна выживать и персистировать в резидентных макрофагах. Т-клетки и продуцируемые ими цитокины активируют антибактериальную активность макрофагов, но этой активации недостаточно для полного контроля инфекции. Активный ТБ проявляется либо в виде прогрессирующего первичного заболевания, либо как результат иммуносупрессии после длительного периода персистирования патогена вследствие нарушения баланса между бактериальной персистенцией и защитными механизмами хозяина в пользу патогена.

M. tuberculosis стимулирует секрецию хемокинов и цитокинов, способствующих мобилизации в участок инфекции дополнительных клеток-резервуаров для *M. tuberculosis*. Выброс аларминов, таких как белки S100, в результате лизиса инфицированных макрофагов способствует дальнейшему поступлению иммунных клеток в легкие. Резидентные и рекрутированные макрофаги собираются в кластеры, давая начало гранулемам — морфологическому признаку ТБ. Гранулемы представляют собой сложные и высокодинамичные клеточные структуры, состоящие из макрофагов на разных стадиях активации, дендритных клеток, нейтрофилов, естественных клеток-киллеров, Т- и В-лимфоцитов. Разнообразие клеточного состава и процессы локальной перестройки (такие как некроз, фиброз, минерализация и казеоз) определяют гетерогенность гранулем и отвечают за наличие

различных вариантов микроокружения в едином фокусе инфекции [10, 14]. Каждая гранулема ведет себя как независимое формирование. То есть у одного больного могут наблюдаться как плотные гранулемы, способные контролировать распространение *M. tuberculosis* и практически безвредные для хозяина, так и казеозные гранулемы — очаги распада функциональных тканей и место размножения *M. tuberculosis* [7, 15, 17]. *M. tuberculosis* в гранулемах могут находиться либо внутри макрофагов, либо в бесклеточных зонах некроза. Разнообразные метаболические (варианты липидов) и анатомические (анормальные кровеносные сосуды) ограничивают поступление антибиотиков в гранулемы [15]. В стенках каверн, сформировавшихся на месте казеозных гранулем, происходит неконтролируемое размножение *M. tuberculosis*, что делает каверны источником мокроты и распространения инфекции [11].

В 2015 г. более 10% связанных с ТБ смертей были обусловлены *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ ТБ) [34]. Развитие лекарственной устойчивости традиционно связывают с несоблюдением больными режима химиотерапии, который обычно состоит из 4 антибиотиков (изониазид, рифампицин, этамбутол и пиразинамид) и продолжается 6 месяцев. В сочетании с недостаточной приверженностью к режиму лечения, генетическая гетерогенность и клональность *M. tuberculosis* больного [5], а также слабая проницаемость туберкулезной гранулемы для лекарства, способны приводить к монотерапии заболевания, несмотря на применение нескольких антибиотиков [15, 22], что в еще большей степени способствует распространению МЛУ и ШЛУ ТБ. Особое беспокойство вызывает факт быстрого распространения устойчивости

к недавно введенным в клиническую практику противотуберкулезным препаратам второго ряда, предназначенным для лечения МЛУ ТБ — даламаниду и бедаквилину [3]. Таким образом, распространение лекарственной устойчивости к химиопрепаратам наряду с ограниченными возможностями химиотерапии у больных МЛУ ТБ и ШЛУ ТБ настоятельно диктуют необходимость дополнения канонической химиотерапии ТБ методами лечения, направленными на хозяина.

МикроРНК (miRs) представляют собой небольшие молекулы некодирующей РНК, способные регулировать разнообразные биологические процессы, такие как клеточный рост и дифференцировка, клеточный метаболизм, иммунный ответ и воспаление. Они влияют на экспрессию генов путем взаимодействия с транскриптами мРНК, вызывая их разрушение либо подавление трансляции [12].

Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что miRs способны регулировать клеточные процессы при различных патологиях легких. Так Sato et al. установили, что мишенью miR-146a является простагландин E2 и показали, что содержание miR-146a снижено в фибробластах, выделенных из легких больных хронической обструктивной болезнью легких [28]. Бактериальный ЛПС стимулирует экспрессию ряда miRs в легких экспериментальных мышей, что позволяет сделать предположение об их ключевой роли в регуляции антибактериального ответа хозяина [23]. Продемонстрирована также вовлеченность miRs в процессы неоплазии легких. Так, например, установлена ассоциация ингибиции экспрессии let-7 miRs с прогрессированием рака легких и укорочением постоперационного срока жизни [30]. Все эти данные указывают на ключевую роль miRs в регуляции легочных заболеваний различной этиологии. Биологическое значение модуляций экспрессии miR организма-хозяина при бактериальных инфекциях остается недостаточно понятным.

МикроРНК — маркеры туберкулезной инфекции

Изначально при туберкулезе miRs использовали в качестве потенциальных биомаркеров инфекции [33]. Содержание miRs определяли в различных биологических образцах — периферической крови, сыворотке, плазме [6], слюне [37] и различных типах клеток. Экспрессируемый набор miRs зависит, в том числе, от генетического фона. Учет этого фактора позволил Miotto et al. повысить чувствительность и специфичность диагности-

ки туберкулеза в этнических группах методом анализа экспрессии miRs [21]. В свою очередь, нашей группе удалось определить набор из 10 miRs по-разному экспрессированных в сыворотке больных фиброзно-кавернозным туберкулезом и в группе лиц, контактирующих с инфекцией. Максимальные изменения выявлены для miR-222, ингибирующей апоптоз, miR-193, участвующей в TGF β -зависимой регуляции фиброза и miR-122, играющей важнейшую роль в регуляции функций печени и известной как биомаркер заболеваний печени (неопубликованные данные). Wagh V. et al. продемонстрировали повышение концентрации miR-16 и снижение miR155 в сыворотке больных ТБ по сравнению со здоровым контролем [31]. Maertzdorf et al. в периферической крови обнаружили кластер из четырех miRs, по-разному экспрессируемых у больных активным туберкулезом и саркоидозом [20]. Zhang et al. посредством регистрации 6 miRs в сыворотке удалось диагностировать ТБ со специфичностью 95% и чувствительностью 92% [38]. Среди miRs, нашедших применения в качестве биомаркеров ТБ, следует отметить let-7e, miR-29c, miR-146a, miR-148a, miR-178, miR-192, miR-193a-5p, miR-365, miR-378 и miR-483.

Профилирование miRs в сыворотке больных ТБ детей позволили Zhou et al. определить набор из 14 miRs, включающий miR-150, miR-146a и miR-125b, который позволяет с высокой степенью достоверности диагностировать ТБ у детей [39]. Fu et al. отмечали повышенную экспрессию 33 (из 92 исследованных) miRs у больных ТБ по сравнению со здоровыми донорами [6]. Среди них наиболее надежным маркером активного ТБ легких проявилась miR-29a [6]. Yi et al. обнаружили 95 miRs по-разному экспрессированных в слюне больных ТБ и здоровых контролей [37]. Эти же авторы определили существенные различия наборов miRs, экспрессированных в слюне и сыворотке крови. Максимальные различия уровней экспрессии в мокроте больных ТБ и здоровых были продемонстрированы для Hsa-miR-3179 и hsa-miR-19b-2* [37].

Несмотря на нарастающее число исследований, направленных на определение дифференцированно экспрессированных паттернов miRs, их значимость для надежной диагностики ТБ в клинике все еще существенно ограничена [36]. Кроме того, существует проблема правильной нормализации уровней miRs в различных группах обследуемых. Сравнительное исследование уровней пригодных для нормализации miRs в популяциях Австралии и Китая установили miR-93 как наиболее надежную в обеих популяциях, в то время как уровни нескольких

miRs существенно различались между этими группами [1]. В настоящее время ряд miRs, таких как miR-223, miR-144* и miR-29, надежно ассоциированы с ответом хозяина на заражение *M. tuberculosis*, однако их значимость для установления диагноза ТБ остается под вопросом.

МикроРНК — регуляторы врожденного иммунного ответа при ТБ

Способность *M. tuberculosis* к эффективному инфицированию в существенной степени зависит от ее способности уклоняться от работающих на ранних стадиях инфицирования защитных механизмов врожденного иммунитета. Для эффективной переработки *M. tuberculosis* макрофаги поляризуются в направлении M1, что связано с активацией транскрипционных факторов, ассоциированных с продукцией антибактериальных эффекторных молекул, таких как оксид азота (NO) и провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и TNF α . В то же время, разрешение воспаления ассоциируется с поляризацией в направлении M2, сопровождаемой увеличением продукции аргиназы и таких цитокинов как IL-10. Sahu et al. удалось показать, что miR-26a взаимодействует с фактором транскрипции KLF4 [27]. Ингибция miR-26a, как в макрофагах *ex vivo*, так и в условиях *in vivo*, ведет к повышению экспрессии KLF4, что, в свою очередь, способствует увеличению активности аргиназы и снижению активности iNOS. При этом KLF4 препятствует попаданию *M. tuberculosis* в лизосомы. Значение данного пути регуляции подтверждается наблюдением об аттенуации выживания *M. tuberculosis* в макрофагах при воздействии мимой miR-26a, а также в дефицитных по KLF4 клетках.

В ряде исследований за последние годы продемонстрирована роль miRNAs в регуляции микобактериальных инфекций [9]. Микобактерии обладают способностью повышать свои шансы на выживании в организме хозяина путем модуляции miRNAs, ассоциированных с сигнальными путями. Продемонстрировано, что при заражении *M. bovis* повышается экспрессия miR-155, что через опосредованные TLR2 и NF- κ B сигнальные пути приводит к активации апоптоза зараженных клеток [8]. Ингибция экспрессии miR-155 макрофагами человека приводит к опосредованному через TLR-МАРК/Akt сигнальные пути снижению ответа на липоарабиноманнан — компонент клеточной стенки микобактерий [25]. Кроме того, miR-155 путем подавления негативного репрессора Rheb участвует в регуляции элиминации микобактерий путем аутофагии [32]. miR-142-3p участвует в контроле раннего этапа биогенеза фаголизосом при микобактериаль-

ной инфекции через взаимодействие с N-Wasp и актин-связывающим белком [2]. На модели заражения микобактериями клеточной линии Raw 264.7 было продемонстрировано, что miR-146a модулирует воспаление через взаимодействие с IRAK1 и TRAF6, что приводит к резкому снижению трансляции IL-6, IL-1 β и TNF α [16]. Kumar et al. показали, что *M. tuberculosis* способна подавлять экспрессию miRNA let-7f, которая взаимодействует с mRNA A20 — ингибитора NF- κ B. Характерно, что у зараженных *M. tuberculosis* мышей ингибция let-7f сопровождается соответствующим повышением экспрессии A20 [13].

Ma et al. на трансгенных мышях с заблокированной продукцией miR-29 анализировали влияние этой микроРНК на секрецию IFN γ . Увеличение синтеза IFN γ у этих мышей сопровождалось повышенной сопротивляемостью к заражению *M. tuberculosis*, преимущественно в результате снижения воспаления и бактериальной нагрузки [19]. Аналогичным образом, сконструировав дефицитных по гену miR-223 мышей, Dorhoi et al. показали, что в отсутствие miR-223 повышается чувствительность мышей к туберкулезу. Заражение таких мышей *M. tuberculosis* ведет к ускоренной миграции нейтрофилов в легкие и, как следствие, к разрушению тканей легкого и увеличению бактериальной нагрузки [4]. В качестве непосредственных мишеней miR-223 были идентифицированы CXCL2, CCL3 и IL-6. Введение нейтрализующих антител к этим медиаторам приводило к восстановлению резистентного фенотипа [4]. В проведенных на больных туберкулезом исследованиях Zhang C. et al. показали, что содержание miR-155 в сыворотке находится в обратной ассоциации с антитуберкулезной активностью NK клеток, и предположили, что эта miR может служить мишенью противотуберкулезной терапии [38]. Таким образом, отдельные miRs могут рассматриваться в качестве потенциальных мишеней для противотуберкулезной терапии.

МикроРНК — регуляторы адаптивного иммунного ответа при ТБ

Течение ТБ характеризуется состоянием длительного хронического воспаления, в ходе которого развивающиеся параллельно или поэтапно регуляторные и провоспалительные процессы влияют на тяжесть и исход заболевания. Большинство компонентов хозяина, задействованных в регуляции воспаления при ТБ, включая цитокины (интерфероны, IL-1, IL-10, TNF) и клетки (нейтрофилы, макрофаги, регуляторные Т клетки (Tregs), Th1, пневмоциты) способны оказывать один из двух типов воздействия: стимулировать или подавлять локальные

иммунные реакции. Как следствие, отдельные медиаторы воспаления способны ограничивать либо потенцировать распространение ТБ в зависимости от времени и места их действия. Определенные компоненты системы защиты хозяина способны оказывать влияние не только на формирование гранулем, но также на их последующую трансформацию в каверны и, в конечном итоге, на распространение ТБ. В целом эти патогенетические особенности указывают на зависимость эволюционного успеха *M. tuberculosis* от ее способности модулировать воспалительные реакции к собственной выгоде. Как про-, так и противовоспалительные воздействия служат элементами стратегии бактерий в борьбе за выживание в организме хозяина.

По сравнению с врожденным иммунным ответом, роль miRs в регуляции реакций адаптивного иммунитета при ТБ менее исследована. Однако известно, что регуляторные Т-клетки секретируют содержащие miRs эндосомы, способные ингибировать патологические Т-хелперы первого типа (Th1) [24]. Транскрипционный анализ и эксперименты по ингибции miRs позволили авторам показать, что перенос содержащих Let-7d miR эндосом от Treg в Th1 клетки способствует подавлению иммунного ответа и препятствует развитию системных аутоиммунных заболеваний.

Установлено, что miR-21 подавляет иммунный ответ по Th1 типу у зараженного *M. tuberculosis* хозяина путем угнетения NF-κB-зависимого пути продукции IL-12 дендритными клетками (DCs) и Т-клетками [35]. Интересно, что при этом повышенная экспрессия miR-21 через взаимодействие с Bcl-2 стимулирует апоптоз зараженных *M. tuberculosis* DCs [26]. Показано, что усиление экспрессии miR-99b стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-12, IL-1β и TNFα) макрофагами и DCs в ответ на заражение *M. tuberculosis*. Подавление синтеза TNFα — ключевой элемент стратегии роста *M. tuberculosis* в DCs, способствующий уклонению бактерии от адаптивного иммунитета хозяина [29]. Эксперименты с трансфекци-

ей Т-клеток предшественником miR-144 позволили предположить, что miR-144 воздействует на противотуберкулезный иммунный ответ, подавляя пролиферацию Т-клеток и ингибируя продукцию IFNγ и TNFα [18].

Заключение

Значимость miRs для фтизиатрии выходит далеко за рамки их потенциальной роли надежных биомаркеров возникновения и характера течения заболевания. Регуляция с помощью miRs вызывает растущий интерес с фармакологической точки зрения. В то время как те miRs, чья экспрессия индуцируется в процессе заболевания, являются новыми мишенями для специфических ингибиторов, стимуляция экспрессии miRs, чья экспрессия, подавляемая в результате инфекции, может рассматриваться как принципиально новое средство противотуберкулезной терапии. В то же время на пути всех возможных клинических приложений miRs имеются проблемы, требующие решения. Первая заключается в большом количестве мишеней. Каждая miR взаимодействует с десятками регуляторных последовательностей, и, следовательно, использование miR в качестве терапевтического средства способно приводить к значительному количеству нежелательных побочных эффектов. Выше мы уже упоминали о трудностях стандартизации в исследованиях, посвященных изучению miRs в качестве биомаркеров заболевания. Отсутствие хороших стандартов в этой области снижает воспроизводимость и затрудняет прямое сравнение результатов, полученных в ходе разных исследований.

По мере нарастания массива данных о новых потенциальных возможностях применения miRs в качестве терапевтических, а также диагностических и прогностических средств во фтизиатрии, реализация этого потенциала становится все более вероятной. Трансляция знаний о роли miRs в патогенезе ТБ в клинику для улучшения жизни больных является критически важным следующим шагом.

Список литературы/References

1. Barry S.E., Chan B., Ellis M., Yang Y., Plit M.L., Guan G., Wang X., Britton W.J., Saunders B.M. Identification of miR-93 as a suitable miR for normalizing miRNA in plasma of tuberculosis patients. *J. Cell. Mol. Med.*, 2015, vol. 19, no. 7, pp. 1606–1613. doi: 10.1111/jcmm.12535
2. Bettencourt P., Marion S., Pires D., Santos L.F., Lastrucci C., Carmo N., Blake J., Benes V., Griffiths G., Neyrolles O., Lugo-Villarino G., Anes E. Actin-binding protein regulation by microRNAs as a novel microbial strategy to modulate phagocytosis by host cells: the case of N-Wasp and miR-142-3p. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2013, vol. 3, 17 p. doi: 10.3389/fcimb.2013.00019
3. Bloemberg G.V., Keller P.M., Stucki D., Trauner A., Borrell S., Latshang T., Coscolla M., Rothe T., Hömke R., Ritter C., Feldmann J., Schulthess B., Gagneux S., Böttger E.C. Acquired resistance to bedaquiline and delamanid in therapy for tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, 2015, vol. 373, no. 20, pp. 1986–1988. doi: 10.1056/NEJMc1505196
4. Dorhoi A., Iannaccone M., Farinacci M., Faé K.C., Schreiber J., Moura-Alves P., Nouailles G., Mollenkopf H.J., Oberbeck-Müller D., Jörg S., Heinemann E., Hahnke K., Löwe D., Del Nonno F., Goletti D., Capparelli R., Kaufmann S.H. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J. Clin. Invest.*, 2013, vol. 123, no. 11, pp. 4836–4848. doi: 10.1172/JCI67604

5. Eldholm V., Balloux F. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: the odd one out. *Trends Microbiol.*, 2016, vol. 24, no. 8, pp. 637–648. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.007
6. Fu Y., Yi Z., Wu X., Li J., Hu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 12, pp. 4246–4251. doi: 10.1128/JCM.05459-11
7. Gengenbacher M., Kaufmann S.H.E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, vol. 36, iss. 3, pp. 514–532. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x
8. Ghorpade D.S., Leyland R., Kurowska-Stolarska M., Patil S.A., Balaji K.N. MicroRNA-155 is required for *Mycobacterium bovis* BCG-mediated apoptosis of macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 2012, vol. 32, no. 12, pp. 2239–2253. doi: 10.1128/MCB.06597-11
9. Harapan H., Fitra F., Ichsan I., Mulyadi M., Miotto P., Hasan N.A., Calado M., Cirillo D.M. The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth? *Tuberculosis (Edinb.)*, 2013, vol. 93, no. 6, pp. 596–605. doi: 10.1016/j.tube.2013.08.004
10. Irwin S.M., Driver E., Lyon E., Schrupp C., Ryan G., Gonzalez-Juarrero M., Basaraba R.J., Nuernberger E.L., Lenaerts A.J. Presence of multiple lesion types with vastly different microenvironments in C3HeB/FeJ mice following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Dis. Model. Mech.*, 2015, vol. 8, no. 6, pp. 591–602. doi: 10.1242/dmm.019570
11. Kaplan G., Post F.A., Moreira A.L., Wainwright H., Kreiswirth B.N., Tanverdi M., Mathema B., Ramaswamy S.V., Walther G., Steyn L.M., Barry C.E.III, Bekker L.G. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 12, pp. 7099–7108. doi: 10.1128/IAI.71.12.7099-7108.2003
12. Krol J., Loedige I., Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, vol. 11, no. 9, pp. 597–610. doi: 10.1038/nrg2843
13. Kumar M., Sahu S.K., Kumar R., Subuddhi A., Maji R.K., Jana K., Gupta P., Raffetseder J., Lerm M., Ghosh Z., Van Loo G., Beyaert R., Gupta U.D., Kundu M., Basu J. MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF-kappa B pathway. *Cell Host Microbe*, 2015, vol. 17, iss. 3, pp. 345–356. doi: 10.1016/j.chom.2015.01.007
14. Lanoix J.P., Lenaerts A.J., Nuernberger E.L. Heterogeneous disease progression and treatment response in a C3HeB/FeJ mouse model of tuberculosis. *Dis. Model. Mech.*, 2015, vol. 8, iss. 6, pp. 603–610. doi: 10.1242/dmm.019513
15. Lenaerts A., Barry C.E.III, Dartois V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 264, iss. 1, pp. 288–307. doi: 10.1111/imr.12252
16. Li S., Yue Y., Xu W., Xiong S.D. MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12: e81438. doi: 10.1371/journal.pone.0081438
17. Lin P.L., Ford C.B., Coleman M.T., Myers A.J., Gawande R., Ioerger T., Sacchetti J., Fortune S.M., Flynn J.L. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat. Med.*, 2014, vol. 20, no. 1, pp. 75–79. doi: 10.1038/nm.3412
18. Liu Y.H., Wang X.J., Jiang J., Cao Z.H., Yang B.F., Cheng X.X. Modulation of T cell cytokine production by miR-144* with elevated expression in patients with pulmonary tuberculosis. *Mol. Immunol.*, 2011, vol. 48, iss. 9–10, pp. 1084–1090. doi: 10.1016/j.molimm.2011.02.001
19. Ma F., Xu S., Liu X., Zhang Q., Xu X., Liu M., Hua M., Li N., Yao H., Cao X. The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-gamma. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 9, pp. 861–869. doi: 10.1038/ni.2073
20. Maertzdorf J., Weiner J.III, Mollenkopf H.-J., TBornotTB Network, Bauer T., Prasse A., Müller-Quernheim J., Kaufmann S.H.E. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 20, pp. 7853–7858. doi: 10.1073/pnas.1121072109
21. Miotto P., Mwangoka G., Valente I.C., Norbis L., Sotgiu G., Bosu R., Ambrosi A., Codecasa L.R., Goletti D., Matteelli A., Ntinginya E.N., Aloï F., Heinrich N., Reither K., Cirillo D.M. MiRNA signatures in sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 11: e80149. doi: 10.1371/journal.pone.0080149
22. Moreno-Gamez S., Hill A.L., Rosenbloom D.I., Petrov D.A., Nowak M.A., Pennings P.S. Imperfect drug penetration leads to spatial monootherapy and rapid evolution of multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 22, pp. E2874–E2883. doi: 10.1073/pnas.1424184112
23. Moschos S.A., Williams A.E., Perry M.M., Birrell M.A., Belvisi M.G., Lindsay M.A. Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics*, 2007, vol. 8 (240), 12 p. doi: 10.1186/1471-2164-8-240
24. Okoye I.S., Coomes S.M., Pelly V.S., Czieso S., Papayannopoulos V., Tolmachova T., Seabra M.C., Wilson M.S. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity*, 2014, vol. 41, iss. 1, pp. 89–103. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.019
25. Rajaram M.V.S., Ni B., Morris J.D., Brooks M.N., Carlson T.K., Bakthavachalu B., Schoenberg D.R., Torrelles J.B., Schlesinger L.S. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 42, pp. 17408–17413. doi: 10.1073/pnas.1112660108
26. Riendeau C.J., Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to mycobacterial infection. *Infect. Immun.*, 2003, vol. 71, no. 1, pp. 254–259. doi: 10.1128/IAI.71.1.254-259.2003
27. Sahu S.K., Kumar M., Chakraborty S., Banerjee S.K., Kumar R., Gupta P., Jana K., Gupta U.D., Ghosh Z., Kundu M., Basu J. MicroRNA 26a (miR-26a)/KLF4 and CREB-C/EBP β regulate innate immune signaling, the polarization of macrophages and the trafficking of *Mycobacterium tuberculosis* to lysosomes during infection. *PLoS Pathog.*, 2017, vol. 13, no. 5: e1006410. doi: 10.1371/journal.ppat.1006410
28. Sato T., Liu X., Nelson A., Nakanishi M., Kanaji N., Wang X., Kim M., Li Y., Sun J., Michalski J., Patil A., Basma H., Holz O., Magnussen H., Rennard S.I. Reduced miR-146a increases prostaglandin E₂ in chronic obstructive pulmonary disease fibroblasts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, vol. 182, no. 8, pp. 1020–1029. doi: 10.1164/rccm.201001-0055OC

29. Singh Y., Kaul V., Mehra A., Chatterjee S., Tousif S., Dwivedi V.P., Suar M., Van Kaer L., Bishai W.R., Das G. Mycobacterium tuberculosis controls microRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, no. 7, pp. 5056–5061. doi: 10.1074/jbc.C112.439778
30. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, iss. 11, pp. 3753–3756. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0637
31. Wagh V., Urhekar A., Modi D. Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy. *Tuberculosis*, 2017, vol. 102, no. 1, pp. 24–30. doi: 10.1016/j.tube.2016.10.007
32. Wang J., Yang K., Zhou L., MinhaoWu, Wu.Y., Zhu M., Lai X., Chen T., Feng L., Li M., Huang C., Zhong Q., Huang X. MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS Pathog.*, 2013, vol. 9, iss. 10:e1003697. doi: 10.1371/journal.ppat.1003697
33. Weiner J., Maertzdorf J., Kaufmann S.H. The dual role of biomarkers for understanding basic principles and devising novel intervention strategies in tuberculosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2013, vol. 1283, iss. 1, pp. 22–29. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06802.x
34. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. URL: <http://www.searo.who.int/tb/documents/global-tuberculosis-report-2016/en> (21.05.2018)
35. Wu Z., Lu H., Sheng J., Li L. Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. *FEBS Lett.*, 2012, vol. 586, iss. 16, pp. 2459–2467. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.004
36. Xu Z., Zhou A., Ni J., Zhang Q., Wang Y., Lu J., Wu W., Karakousis P.C., Lu S., Yao Y. Differential expression of miRNAs and their relation to active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*, 2015, vol. 95, no. 5, pp. 395–403. doi: 10.1016/j.tube.2015.02.043
37. Yi Z., Fu Y., Ji R., Li R., Guan Z. Altered microRNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 8: e43184. doi: 10.1371/journal.pone.0043184
38. Zhang X., Guo J., Fan S., Li Y., Wei L., Yang X., Jiang T., Chen Z., Wang C., Liu J., Ping Z., Xu D., Wang J., Li Z., Qiu Y., Li J.C. Screening and identification of six serum microRNAs as novel potential combination biomarkers for pulmonary tuberculosis diagnosis. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 12: e81076. doi: 10.1371/journal.pone.0081076
39. Zhou M., Yu G., Yang X., Zhu C., Zhang Z., Zhan X. Circulating microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Mol. Med. Rep.*, 2016, vol. 13, iss. 6, pp. 4620–4626. doi: 10.3892/mmr.2016.5097

Авторы:

Еремеев В.В., д.м.н., зав. лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Евстифеев В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Шепелькова Г.С., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Эргешова А.Э., младший научный сотрудник отдела хирургии ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия;

Багиров М.А., д.м.н., профессор, зав. отделом хирургии, ФГБУ ЦНИИ туберкулеза, Москва, Россия.

Authors:

Yermeev V.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Department of Immunology, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Department of Immunology, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics and Cell Technologies, Department of Immunology, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Ergeshova A.E., Junior Researcher, Department of Surgery, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation;

Bagirov M.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Surgery, Central Research Institute of Tuberculosis, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 20.10.2017
Отправлена на доработку 01.05.2018
Принята к печати 22.05.2018

Received 20.10.2017
Revision received 01.05.2018
Accepted 22.05.2018

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ *S. TRACHOMATIS* И *S. PNEUMONIAE*, У БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Н.Е. Бондарева¹, Е.Ю. Моргунова¹, Н.А. Зигангирова¹, Ю.Г. Шапкин²,
Ю.В. Чалык², Р.Ю. Чалык³

¹ ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, г. Саратов, Россия

³ МУЗ Городская клиническая больница № 6 им. академика В.Н. Кошелева, г. Саратов, Россия

Резюме. К настоящему времени данными клинических наблюдений убедительно показано, что возбудители хламидийных инфекций, *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*, способны вызывать серьезные заболевания с тяжелыми осложнениями и последствиями. Имеются предположения, что развившаяся хроническая хламидийная инфекция может стать важным фактором в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), которые проявляются в так называемый постинфекционный период. Как известно, хламидийная инфекция обладает тропизмом к цилиндрическому эпителию, который у человека выстилает слизистую оболочку уретры, цервикального канала, прямой кишки, конъюнктивы глаз и области глотки. Однако роль возбудителей хламидийных инфекций, таких как *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*, в возникновении заболеваний ЖКТ человека не изучена. С целью изучения возможной взаимосвязи между заболеваниями ЖКТ и наличием маркеров хламидийной инфекции была отобрана группа больных с заболеваниями органов ЖКТ, у которых проводили выявление антител к *S. trachomatis* и *S. pneumoniae* и ДНК этих возбудителей в сыворотке крови, биоптатах печени и желчевыводящих протоков. В результате ДНК *S. trachomatis* в сыворотке крови была выявлена в 50% случаев, а в биоптатах печени в 59,3%. Разработан новый подход в серологической диагностике хламидийной инфекции, вызванной *S. trachomatis*, который позволил выявить диагностические титры антител в этой группе больных в 51,9% случаев, в группе сравнения в 11,6% случаев. Среди 50% больных, у которых ДНК была выявлена в сыворотке крови, в 64,3% случаев она также выявлялась в биоптатах органов ЖКТ. При обнаружении ДНК *S. trachomatis* в сыворотке крови антитела к «культуральному» антигену обнаруживались в 60,1% случаев, а при одновременном обнаружении ДНК *S. trachomatis* в сыворотке крови и органах ЖКТ они обнаруживались в 72,2% случаев. Одновременное выявление *S. trachomatis* как в сыворотке крови, так и в органах ЖКТ может свидетельствовать о способности *S. trachomatis* распространяться гематогенным путем и инфицировать органы, удаленные от первичного очага инфекции. Полученные данные, безусловно, требуют даль-

Адрес для переписки:

Бондарева Наталия Евгеньевна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ.
Тел.: 8 962 985-07-55 (моб.).
E-mail: natalia.d@mail.ru

Contacts:

Natalia E. Bondareva
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 962 985-07-55 (mobile).
E-mail: natalia.d@mail.ru

Библиографическое описание:

Бондарева Н.Е., Моргунова Е.Ю., Зигангирова Н.А., Шапкин Ю.Г., Чалык Ю.В., Чалык Р.Ю. Выявление маркеров инфекции, обусловленной *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*, у больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 316–324. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-316-324

Citation:

Bondareva N.E., Morgunova E.Yu., Zigangirova N.A., Shapkin Yu.G., Chalyk Yu.V., Chalyk R.Yu. Identification markers of infection due to *S. trachomatis* and *S. pneumoniae*, in patients with diseases of the gastrointestinal tract // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 316–324. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-316-324

нейшего изучения в свете выявления связи между обнаружением возбудителя и развитием патологии органов ЖКТ, однако в целом результаты являются еще не изученным свидетельством возможности инфицирования *C. trachomatis* органов ЖКТ.

Ключевые слова: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, хламидийная инфекция, персистентная инфекция, желудочно-кишечный тракт, ПЦР.

IDENTIFICATION MARKERS OF INFECTION DUE TO *C. TRACHOMATIS* AND *C. PNEUMONIAE*, IN PATIENTS WITH DISEASES OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

Bondareva N.E.^a, Morgunova E.Yu.^a, Zigangirova N.A.^a, Shapkin Yu.G.^b, Chalyk Yu.V.^b, Chalyk R.Yu.^c

^a Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation

^c Saratov City Clinical Hospital No. 6 named after academician V.N. Kosheleva, Saratov, Russian Federation

Abstract. To date, clinical data have convincingly shown that *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* infectious can cause serious diseases with severe complications and consequences. There are assumptions that the developed chronic chlamydial infection can become an important factor in the pathogenesis of the gastrointestinal tract diseases, which are manifested in the so-called post-infectious period. It is commonly known that chlamydial infection has a tropism to the cylindrical epithelium, which covers the human mucous membrane of the urethra, cervix, rectum, conjunctiva of the eyes and the throat. However, the role of the causative agents of chlamydial infections, such as *C. trachomatis* and *C. pneumoniae*, in the occurrence of the gastrointestinal tract diseases has not been studied. In order to study the possible relationship between the gastrointestinal diseases and the presence of chlamydial infection markers, we have selected a group of patients with the gastrointestinal diseases and detected antibodies to *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* and DNA of these pathogens in blood serum, liver biopsy and bile ducts. As a result, *C. trachomatis* DNA in blood serum was detected in 50% of cases, and in liver biopsies — in 59.3%. A new approach has been developed in the serological diagnosis of chlamydial infection caused by *C. trachomatis*, which allowed for revealing diagnostic antibody titers in 51.9% of cases in this group of patients, and in the comparison group — in 11.6% of cases. Among 50% of patients, in whom DNA was revealed in blood serum, it was also revealed in 64.3% of cases in biopsy samples of gastrointestinal organs. Upon detection of *C. trachomatis* DNA in blood serum, antibodies to the “cultural” antigen were detected in 60.1% of cases, and with the simultaneous detection of *C. trachomatis* DNA in blood serum and gastrointestinal organs, they were found in 72.2% of cases. Simultaneous detection of *C. trachomatis*, both in blood serum and in the gastrointestinal tract, may indicate the ability of *C. trachomatis* to spread hematogenously and infect organs away from the primary focus of infection. The obtained data absolutely require further study in light of the identification of the relationship between the detection of the pathogen and the development of the gastrointestinal pathology. But in general, the results are not yet studied evidence of the possible gastrointestinal organs infection by *C. trachomatis*.

Key words: *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, chlamydial infection, persistent infection, gastrointestinal tract, PCR.

Введение

К настоящему времени данными клинических наблюдений убедительно показано, что возбудители хламидийных инфекций, *C. trachomatis* и *C. pneumoniae*, способны вызывать серьезные заболевания с тяжелыми осложнениями и последствиями.

У женщин восходящее течение инфекции приводит к развитию воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ). В результате хронического воспаления фаллопиевых труб может развиваться бесплодие. По различным оценкам, его частота составляет 10–40% нелеченых случаев хламидиоза у женщин [13]. Кроме того, на фоне специфического воспаления (сальпингита) возрастает риск внематочной беременности, хронического тазового болевого синдрома, тазового перитонита, выкидышей и преждевременных родов. У беременных ин-

фицированных женщин, высока вероятность рождения недоношенного ребенка и его инфицирования с развитием конъюнктивита и пневмонии [21, 24].

По разным данным *C. pneumoniae* обнаруживаются примерно в 10–20% случаев заболеваний респираторного тракта (синуситы, фарингиты, отиты, бронхиты, пневмонии, эмфизема), в период эпидемии эти показатели могут увеличиваться до 25% [7, 10]. У детей описано коклюшеподобное течение хламидийных пневмоний [17]. В 11% случаев острых бронхитов в мазках из зева и носоглотки обнаруживаются *C. pneumoniae* [5].

В последнее время накапливается все больше данных об участии *C. pneumoniae* в развитии атеросклероза, инфаркта миокарда, болезни Альцгеймера, бронхиальной астмы, саркоидоза, реактивных артритов, синдрома Рейтера и узловой эритемы [2, 4, 9, 27].

Несмотря на широкий спектр клинических проявлений, патогенез хламидийных инфекций достаточно сложен и не до конца изучен. Его условно можно разделить на несколько стадий: инфицирование слизистых оболочек; первичная региональная инфекция с поражением клеток-мишеней; дальнейшее распространение процесса с множественными поражениями эпителиальных клеток и клиническими симптомами болезни; развитие иммунопатологических реакций; клиника последствий (резидуальная фаза) с образованием морфологических и функциональных изменений в различных органах и системах (при этом возбудитель в организме отсутствует) [1].

Разнообразие клинических проявлений и патогенез хламидийной инфекции связаны со способностью возбудителей хламидиоза к персистенции, благодаря которой патоген может длительно сохраняться в организме в латентном состоянии и приводить к хронической инфекции. В организме хозяина под воздействием различных факторов, в том числе медиаторов воспаления, а также антибиотиков, у хламидий нарушается типичный цикл развития и образуются персистирующие формы. Для этих форм характерна преимущественно внутриклеточная локализация, нарушение деления и метаболизма, а также изменение паттерна антигенных детерминант [8]. Состояние персистенции является обратимым, а восстановление нормального репликативного цикла происходит при возврате в благоприятные условия [15, 26].

В исследованиях нашей лаборатории ранее было показано, что *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* могут распространяться гематогенным путем, при котором внеклеточная форма хламидий — элементарные тельца (ЭТ) — обнаруживаются в сыворотке крови. Циркулирующие в кровяном русле инфекционные ЭТ способны поражать различные органы и ткани, удаленные от первичного очага инфекции, и приводить к хронизации [18]. Тем самым, генерализация инфекции является ключевым фактором развития хронических хламидийных инфекций различной локализации. Особое внимание в последнее время уделяется выявлению *C. trachomatis* в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) при бессимптомном или хроническом течении инфекции ввиду ее возможного участия в патогенезе заболеваний прямой кишки [6, 11, 12].

Появилось предположение, что развившаяся хроническая хламидийная инфекция может стать важным фактором в патогенезе заболеваний ЖКТ, которые проявляются в так называемый постинфекционный период. Как известно, хламидийная инфекция обладает тропизмом

к цилиндрическому эпителию, который у человека выстилает слизистую оболочку уретры, цервикального канала, прямой кишки, конъюнктивы глаз и области глотки. Это обуславливает возможность колонизации хламидиями широкого спектра органов экстрагенитальной локализации и приводит к установлению хронического инфицирования этих органов [23].

Целью данной работы явилось изучение возможной взаимосвязи между заболеваниями ЖКТ и наличием маркеров хламидийной инфекции. Для этого была проанализирована группа больных с заболеваниями ЖКТ (язвой желудка и двенадцатиперстной кишки, острым и хроническим калькулезным холециститом, панкреатитом, опухолями желудка, раком желудка и ректосигмоидного отдела толстой кишки), у которых проводили выявление антител к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* и ДНК этих возбудителей в сыворотке крови, биоптатах печени и желчевыводящих протоках.

Материалы и методы

Пациенты

Протокол исследования был одобрен местным Этическим комитетом. Все пациенты были информированы о цели исследования и дали письменное согласие на участие в нем. В основную группу исследования были включены 54 пациента с заболеваниями органов ЖКТ (острый и хронический холецистит, язвенная болезнь желудка, острый панкреатит), 34 женщины и 20 мужчин в возрасте от 38 до 64 лет. Также была проанализирована группа сравнения, которая состояла из 43 пациентов (26 мужчин и 17 женщин в возрасте от 39 до 70 лет) с острым аппендицитом и онкологическими заболеваниями ЖКТ.

Клинический материал

Образцы печени и желчного пузыря были получены при лапароскопических вмешательствах. Образцы сыворотки были получены от всех пациентов до проведения операции и хранились при -70°C . Исследование не мешало терапевтической подготовке пациентов к операции и не оказывало влияния на послеоперационное лечение.

Также были собраны образцы (биоптаты печени, желудка, кишечника и сыворотки крови) от 43 пациентов с острым аппендицитом и онкологическими заболеваниями ЖКТ.

Все образцы были собраны в стерильных условиях операционной и помещены в микроцентрифужные пробирки, которые запечатывались в операционном зале и открывались только в ламинарном шкафу в безопасных стерильных условиях лаборатории.

Серологическое исследование образцов сыворотки

Определение титра антител к C. trachomatis и C. pneumoniae методом МИФ. Титры антител в сыворотках классов IgG, IgM и IgA к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* определяли с помощью метода микроиммунофлуоресценции (МИФ) с иммобилизованными антигенами *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* по стандартному протоколу [22]. Детекцию связавшихся антител с антигенами *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* проводили с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека (IgG, IgM и IgA), конъюгированных с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Результаты оценивали путем просмотра под люминесцентным микроскопом Nikon Eclipse 50i при увеличении x1500. В случае специфического связывания антител с антигеном наблюдается ярко-зеленое свечение.

Определение антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 C. trachomatis в сыворотках крови методом ИФА. Выявление антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *C. trachomatis*, а также выявления антител класса IgG к *C. trachomatis* проводили по стандартной методике, описанной в протоколе Вектор-Бест (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Определение антител к «культуральному» антигену C. trachomatis в образцах сывороток. Для выявления комплекса белков, которые хламидии секретируют в мембрану включения, так называемого «культурального» антигена, использовали монослой клеток McSoy, инфицированных *C. trachomatis* сероваром D в формате 96-луночных планшетов. После 20-часового инкубирования монослой инфицированных клеток дважды промывали ФСБР, планшеты высушивали на воздухе, добавляли в лунки по 40 мкл охлажденного метилового спирта, фиксировали 20 мин при +4°C, отбирали спирт и высушивали на воздухе. Детекцию антител к *C. trachomatis* в анализируемых сыворотках проводили непрямой метод с помощью вторичных антител к иммуноглобулинам человека (IgG, IgM и IgA), конъюгированных с ФИТЦ. Результаты оценивали путем просмотра под люминесцентным микроскопом Nikon Eclipse 50i при увеличении x20. В случае специфического связывания антител с антигеном наблюдается ярко-зеленое свечение хламидийных включений в монослое клеток.

Выделение ДНК из клинического материала и сыворотки крови. Образцы биоптатов печени гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора. Выделение ДНК из гомогенатов органов и сыворотки крови производилось с использованием автоматизированной системы NucliSENS easyMAG (BioMérieux Inc.,

Нидерланды). Образцы объемом 1 мл лизировали при температуре 58°C в течение 1 ч в 1 мл лизирующего буфера с протеиназой К («Синтол», Россия). ДНК элюировалась из системы в конечном объеме 50 мкл.

Определение ДНК хламидий в клинических образцах методом ПЦР-РВ. Определение ДНК хламидий проводили с использованием количественного варианта ПЦР-РВ. Для постановки амплификации использовали наборы реагентов для обнаружения ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae*: «C. trachomatis-РВ» для количественного определения ДНК *C. trachomatis*, «C. pneumoniae-РВ» для количественного определения ДНК *C. pneumoniae* (ЗАО «Синтол»). Для постановки ПЦР-РВ использовали амплификатор CFX-96 (Bio-Rad, США).

Результаты

Определение АТ к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* в сыворотке крови методом МИФ

Метод микроиммунофлуоресценции основан на выявлении полного комплекса антигенов наружной мембраны хламидий и является «золотым стандартом» серологической диагностики хламидийной инфекции. В качестве антигена в данном тесте используются хламидийные элементарные тельца. Метод МИФ обладает высокой видовой специфичностью и позволяет дифференцировать антитела классов IgG, IgM и IgA.

При хламидийной инфекции выявление антител разных классов происходит через разные промежутки времени после заражения. Известно, что при первичном инфицировании сначала появляются антитела класса IgM, затем IgG и в последнюю очередь IgA. При повторном инфицировании характерно быстрое нарастание титра антител IgG и IgA и практически полное отсутствие антител класса IgM. Для хронической хламидийной инфекции маркеры антител не определены, однако предполагается, что о ее наличии может свидетельствовать обнаружение сочетания титров антител классов IgG и IgA.

В наших исследованиях в реакции МИФ диагностическими титрами являлись для *C. trachomatis* антитела классов: IgG \geq 1:32, IgM \geq 1:16 и IgA \geq 1:32. Диагностически значимыми серологическими маркерами для острой хламидийной инфекции, вызванной *C. trachomatis*, было наличие антител класса IgM, а также сочетание антител классов IgM+IgG или IgM+IgG+IgA. О хронической инфекции, связанной с *C. trachomatis*, могло свидетельствовать обнаружение антител класса IgG, а также сочетание IgG+IgA.

Для острой инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, диагностическим критерием являлось обнаружение антител класса IgG $\geq 1:512$, а также сочетание IgG $\geq 1:512$ +IgM, для хронической — сочетание IgM+IgA, IgG $\geq 1:64$, IgM $\geq 1:16$ и IgA $\geq 1:64$.

Методом МИФ было проанализировано 54 образца сыворотки от пациентов с различными заболеваниями ЖКТ и 43 образца из группы сравнения на присутствие в них специфических антител классов IgG, IgM и IgA к *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*. В результате было выявлено, что антитела, свидетельствующие о наличии хламидийной инфекции, вызванной *S. trachomatis*, не были обнаружены в исследуемых группах пациентов. В опытной группе в 1,9%, а в группе сравнения в 4,7% случаев были выявлены антитела к *S. pneumoniae*, относящиеся к классам IgG и IgA, в титрах не выше 1:128 для IgG и 1:32 для IgA.

Обнаружение антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *S. trachomatis*

Ранее было показано, что при хронической хламидийной инфекции у *S. trachomatis* усиливается экспрессия белка теплового шока (Hsp60), выявляемого на поверхности клетки-хозяина и выделяющегося во внеклеточное пространство и кровотока. Антитела к этому белку рассматриваются в качестве диагностического критерия персистентной хламидийной инфекции [25]. С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) были проведены исследования по выявлению антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *S. trachomatis* в сыворотках крови, полученных от 54 пациентов с заболеванием ЖКТ и 43 пациентов из группы сравнения. Было показано, что у 9,3% пациентов обнаруживались антитела класса IgG к Hsp60 *S. trachomatis*. В группе сравнения антитела класса IgG к Hsp60 *S. trachomatis* обнаружены не были.

Обнаружение антител к «культуральному» антигену *S. trachomatis* в сыворотках крови

В процессе внутриклеточного развития хламидии секретируют белки, которые встраиваются в мембрану фагосомы, содержащей хламидии, так называемые хламидийные включения. Для обнаружения антител, которые секретируются на внутриклеточном этапе развития хламидий, в качестве антигена мы использовали 20-часовой монослой клеток McCoу, инфицированный *S. trachomatis* серовара D, в котором присутствовали хламидийные включения. Затем проводили реакцию микроиммунофлюоресценции, как указано выше, для выявления антител. В случае специфического связывания

антител с антигеном наблюдается ярко-зеленое свечение хламидийных включений в монослой клеток. При отрицательном результате флюоресценция отсутствовала. Диагностическим титром при однократном исследовании считалось разведение 1:16 и выше.

Метод определения антител к «культуральному» антигену был отработан на панели сывороток. В качестве положительных были взяты сыворотки от больных, с подтвержденной методом ПЦР урогенитальной хламидийной инфекцией (положительный соскоб) и диагностическим титром антител, определенным методом МИФ. Также была использована панель отрицательных сывороток от людей с отсутствием жалоб на заболевания урогенитальной сферы и отсутствием хламидийных антител. Было показано, что на панели положительных сывороток антитела к «культуральному» антигену обнаруживались в 80% случаев, при исследовании отрицательных сывороток антитела выявлены не были.

При определении антител IgG к «культуральному» антигену *S. trachomatis* в сыворотках крови исследуемой группы больных с заболеваниями ЖКТ в 51,9% случаев был получен положительный результат. В группе сравнения антитела к «культуральному» антигену определялись в 11,6% случаев.

Определение ДНК *S. trachomatis* и *S. pneumoniae* методом ПЦР в сыворотке крови

Ранее в нашей лаборатории был разработан подход для выявления ДНК *S. trachomatis* и *S. pneumoniae* в сыворотке крови. Он основан на использовании эффективного метода выделения ДНК, позволяющего минимизировать потери и избежать перекрестной контаминации, и тест-систем для амплификации, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью. Каждая постановка включает в себя контроль выделения, а также положительный и отрицательный контроль реакции амплификации [29]. При использовании разработанного метода для выявления ДНК хламидий в сыворотке крови было показано, что в группе пациентов с заболеваниями ЖКТ ДНК *S. trachomatis* обнаруживалась в 50% случаев, ДНК *S. pneumoniae* — в 3,7%. В группе сравнения ДНК исследуемых возбудителей в сыворотке крови выявлена не была. Количество ДНК для двух видов хламидий в пересчете на ГЭ для *S. trachomatis* составило от $0,4 \times 10$ до $4,1 \times 10^2$ ГЭ/мл, и от 6×10 — 6×10^2 ГЭ/мл — *S. pneumoniae*. Определение ДНК является методом прямого выявления возбудителя и может свидетельствовать о наличии текущей хламидийной инфекции.

Таблица. Определение ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* методом ПЦР анализа в сыворотке крови и биоптатах органов желудочно-кишечного тракта

Table. DNA determination of *C. trachomatis* and *C. pneumoniae* by PCR analysis in blood serum and biopsy specimens of the gastrointestinal organs

Материал Material	<i>C. trachomatis</i>		<i>C. pneumoniae</i>	
	Опытная группа Experimental group	Группа сравнения Comparison group	Опытная группа Experimental group	Группа сравнения Comparison group
Сыворотка Serum	50%	0	3,7%	0
Печень Liver	59,3%	0	13%	0
Желчный пузырь Gallbladder	16,7%	0	5,6%	0

Определение ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* методом ПЦР в биоптатах органов ЖКТ

В нашем исследовании биоптаты печени были получены от всех больных с заболеваниями органов ЖКТ, биоптаты желчного пузыря от 29,6% больных. В группе сравнения были получены биоптаты других органов ЖКТ (желудок, аппендикс, прямая кишка). При определении ДНК в биоптатах было показано, что ДНК *C. trachomatis* обнаруживалась в 59,3% образцов печени и в 16,7% образцов желчного пузыря. ДНК *C. pneumoniae* была выявлена в 13% биоптатов печени и в 5,6% — желчного пузыря (табл.). В группе сравнения ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* выявлена не была. Количество в ГЭ для *C. trachomatis*, обнаруженное в печени составило $2,5 \times 10^2 - 8,5 \times 10^2$, для *C. pneumoniae* — $5,1 \times 10^2 - 1 \times 10^4$; в желчном пузыре — *C. trachomatis* — $9 \times 10^2 - 1,9 \times 10^4$, *C. pneumoniae* — $2 \times 10^2 - 5,4 \times 10^3$.

Обсуждение

Известно, что хламидийная инфекция распространена повсеместно, однако ее участие в возникновении заболеваний органов ЖКТ не изучено. Целью настоящего исследования было определить возможную взаимосвязь обнаружения маркеров хламидийной инфекции и возникновения заболеваний ЖКТ.

В нашем исследовании для выявления хламидийной инфекции мы использовали методы прямого выявления возбудителя в сыворотке крови и органах ЖКТ, а также методы выявления серологических маркеров (МИФ, обнаружение антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *C. trachomatis* и определение антител к «культуральному» антигену *C. trachomatis*). В основную группу были отобраны больные с заболеваниями органов ЖКТ (острый и хронический холецистит, язвенная болезнь желудка,

ка, острый панкреатит, рак желудка), 34 женщины и 20 мужчин в возрасте от 38 до 64 лет с отсутствием жалоб на текущую урогенитальную и респираторную инфекцию.

Изучая биоптаты органов больных с заболеваниями ЖКТ, мы в значительном проценте случаев выявили ДНК *C. trachomatis* (59,3% — в печени и 16,7% — в желчном пузыре). ДНК *C. trachomatis* в сыворотке крови была обнаружена в 50% случаев, в контрольной группе ДНК выявлена не была.

Были использованы также серологические методы, которые, как известно, имеют вспомогательное значение при диагностике хламидийных инфекций, с целью возможного определения серологических маркеров, свидетельствующих о наличии инфекции. Метод микроиммунофлюоресценции является «золотым стандартом» серологической диагностики хламидийной инфекции, ввиду того, что он основан на выявлении полного комплекса антигенов наружной мембраны. В нашем исследовании, при использовании этого метода для выявления антител разных классов в сыворотках больных с заболеваниями ЖКТ антитела к *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* выявлены не были. Доказано, что обнаружение антител класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *C. trachomatis* свидетельствует о наличии воспалительного заболевания органов малого таза, внематочной беременности, трахомы или трубного бесплодия [14, 16, 18, 19, 20, 28]. В нашем исследовании при использовании этого метода в 9,3% сывороток больных с заболеваниями ЖКТ были выявлены антитела класса IgG к белку теплового шока Hsp60 *C. trachomatis*.

Как известно, персистирующие формы хламидий локализуются и длительно сохраняются внутриклеточно. Мембрана хламидийного включения является важной структурой, осуществляющей связь между клеткой хозяина и бактерией. Мембрана включений содержит большое количество интегральных белков хла-

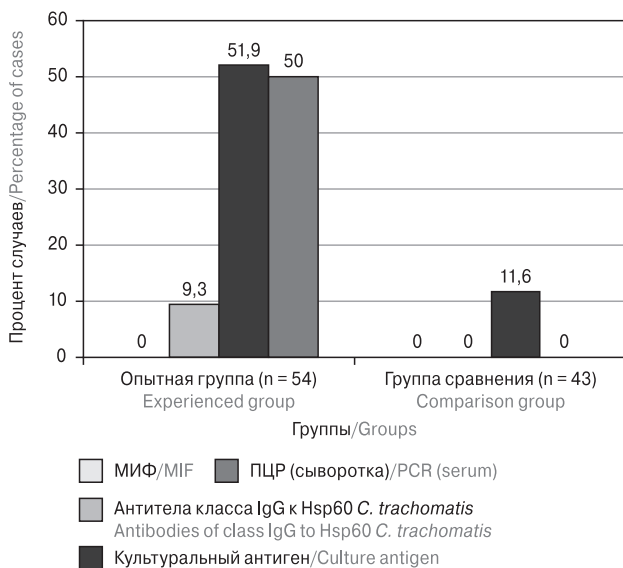


Рисунок. Сравнение эффективности методов выявления маркеров хронической хламидийной инфекции в сыворотке крови

Figure. Comparison of the effectiveness of methods for detecting markers of chronic Chlamydia infection in serum

мидий, которые и являлись основной мишенью в методе выявления антител к «культуральному» антигену. Этот метод позволил выявить антитела в 51,9% сывороток в группе пациентов с заболеваниями ЖКТ в сравнении с 11,6% в группе сравнения (рис.).

Ранее в нашей лаборатории проводилось исследование гематогенного пути распространения хламидий при воспалительных заболеваниях органов малого таза. Были исследованы образцы сывороток от 52 человек с диагностированной хламидийной инфекцией. Диагноз урогенитальный хламидиоз был подтвержден посредством культурального посева соскоба, а также выделения из него ДНК. При определении ДНК в сыворотке крови было выявлено 94,2% положительных образцов в сравнении с контрольной группой, где все сыворотки были отрицательными на наличие ДНК *C. trachomatis*. Количество ДНК составляло от 2×10^2 до 10^3 ГЭ/мл сыворотки крови [29]. Возможный гематогенный путь распространения хламидий был показан также в другой работе [3], где выявление возбудителя в крови у больных урогенитальной инфекцией достигало 100%.

Была проведена работа по одновременно выявлению *C. trachomatis* в клетках печени и сыворотке крови у больных с острым холециститом. В результате было показано, что при

циркуляции патогена в сыворотке крови в 55% случаев возможно инфицирование печени.

В текущей работе ДНК *C. trachomatis* в сыворотке крови была обнаружена у 50% пациентов. У этих же больных в 64,3% ДНК *C. trachomatis* выявлялась и в биоптатах органов ЖКТ. При обнаружении ДНК *C. trachomatis* в сыворотке крови антитела к «культуральному» антигену обнаруживались в 60,1% случаев, а при одновременном обнаружении ДНК *C. trachomatis* в сыворотке крови и органах ЖКТ, они обнаруживались в 72,2% случаев.

Урогенитальный хламидиоз характеризуется весьма широким спектром осложнений, связанных с диссеминацией *C. trachomatis* из первичного очага инфекции в удаленные органы. На данный момент достаточно хорошо изучены интраканаликулярный (восходящий), лимфогенный и интранатальный (при прохождении через родовые пути) пути распространения патогена. Тем не менее, экстрагенитальную патологию, такую как артриты и внутриутробное инфицирование плода, обусловленные *C. trachomatis*, многие клиницисты рассматривают как следствие диссеминации патогена гематогенным путем. Однако на сегодняшний день существует достаточно ограниченное количество исследований, доказывающих ключевую роль данного пути в развитии экстрагенитальной патологии хламидийной этиологии. В связи с этим, актуальным является детальное изучение механизмов распространения *C. trachomatis* гематогенным путем.

В результате проведенного исследования была выявлена ДНК *C. trachomatis* как в сыворотке крови, так и в клетках печени и желчного пузыря у пациентов с заболеваниями органов ЖКТ. Одновременное выявление *C. trachomatis* как в сыворотке крови, так и в органах ЖКТ, может свидетельствовать о способности *C. trachomatis* распространяться гематогенным путем и инфицировать органы, удаленные от первичного очага инфекции. Использование методов серологической диагностики показало, что при персистентной инфекции наиболее достоверно выявляются антитела к антигенам внутриклеточного этапа развития, выявление других антител было малоэффективно.

Полученные данные, безусловно, требуют дальнейшего изучения в свете выявления связи между обнаружением возбудителя и развитием патологии органов ЖКТ, однако в целом результаты являются еще не изученным свидетельством возможности инфицирования *C. trachomatis* органов ЖКТ.

Список литературы/References

1. Абакарова П.Р. Урогенитальный хламидиоз: принципы диагностики и лечения // Гинекология. 2006. Т. 8, № 2. С. 21–23. [Abakarova P.R. Urogenital chlamydia: principles of diagnosis and treatment. *Ginekologiya = Gynecology*, 2006, vol. 8, no. 2, pp. 21–23. (In Russ.)]
2. Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. Киев, 2005. 524 с. [Mavrov G.I. Khlamidiinye infektsii: biologiya vzbuditelei, patogenez, klinika, diagnostika, lechenie, profilaktika [Chlamydial infections: biology of pathogens, pathogenesis, clinic, diagnosis, treatment, prevention]. Kiev, 2005. 524 p.]
3. Султанакмедов Э.С., Утц С.Р., Салтыков Ю.В., Мотин В.Л., Федорова В.А. Детекция Chlamydia trachomatis в образцах крови как метод диагностики осложненных и персистирующих форм урогенитальной хламидийной инфекции // Саратовский научно-медицинский журнал. 2015. Т. 11, № 3. С. 381–385. [Sultanakhmedov E.S., Utz S.R., Saltykov Y.V., Motin V.L., Fedorova V.A. Detection of Chlamydia trachomatis in blood samples as a diagnostic method for complicated and persistent forms of urogenital Chlamydia infections. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2015, vol. 11, no. 3, pp. 381–385. (In Russ.)]
4. Al-Aydie S.N., Obeidat N.M., Al-Younes H.M. Role of Chlamydia pneumoniae in community-acquired pneumonia in hospitalized Jordanian adults // *J. Infect. Dev. Ctries*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 227–236. doi: 10.3855/jidc.6590
5. Bartlett J.G., Breiman R.F., Mandell L.A., Fine T.M. Jr. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. *Clin. Infect. Dis.*, 1998, vol. 26, no. 4, pp. 811–838. doi: 10.1086/513953
6. Beatty W.L., Morrison R.P., Byrne G.I. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol. Rev.*, 1994, vol. 58, no. 4, pp. 686–699.
7. Blasi F., Damato S., Cosentini R., Tarsia P., Raccanelli R., Centanni S., Allegra L.; Chlamydia InterAction with COPD (CIAC) Study Group. Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment. *Thorax*, 2002, vol. 57, no. 8, pp. 672–676. doi: 10.1136/thorax.57.8.672
8. Caldwell H.D., Wood H., Crane D., Bailey R., Jones R.B., Mabey D., Maclean I., Mohammed Z., Peeling R., Roshick C., Schachter J., Solomon A.W., Stamm W.E., Suchland R.J., Taylor L., West S.K., Quinn T.C., Belland R.J., McClarty G. Polymorphisms in Chlamydia trachomatis tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J. Clin. Invest.*, 2003, vol. 111, no. 11, pp. 1757–1769. doi: 10.1172/JCI17993
9. Carter J.D., Inman R.D. Chlamydia-induced reactive arthritis: hidden in plain sight? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2011, vol. 25, no. 3, pp. 359–374. doi: 10.1016/j.berh.2011.05.001
10. Choroszy-Król I., Frej-Mądrzak M., Hober M., Sarowska J., Jama-Kmieciak A. Infections caused by Chlamydia pneumoniae. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2014, vol. 23, no. 1, pp. 123–126
11. Dlugosz A., Törnblom H., Mohammadian G., Morgan G., Veress B., Edvinsson B., Sandström G., Lindberg G. Chlamydia trachomatis antigens in enteroendocrine cells and macrophages of the small bowel in patients with severe irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.*, 2010, vol. 10: 19. doi: 10.1186/1471-230X-10-19
12. Francis C., Prior A., Whorwell P.J., Morris J. Chlamydia trachomatis infection: is it relevant in irritable bowel syndrome? *Digestion*, 1998, vol. 59, no. 2, pp. 157–159. doi: 10.1159/000007481
13. Haggerty C.L., Gottlieb S.L., Taylor B.D., Low N., Xu F., Ness R.B. Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J. Infect. Dis.*, 2010, vol. 201, no. 2, pp. 134–155. doi: 10.1086/652395
14. Jakus S., Neuer A., Dieterle S., Bongiovanni A.M., Witkin S.S. Antibody to the Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein in follicular fluid and in vitro fertilization outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2008, vol. 59, no. 2, pp. 85–89. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00539.x
15. Linhares I.M., Witki S.S. Immunopathogenic consequences of Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein expression in the female reproductive tract. *Cell. Stress Chaperones*, 2010, vol. 15, no. 5, pp. 467–473. doi: 10.1007/s12192-010-0171-4
16. Mascellino M.T., Ciardi M.R., Oliva A., Cecinato F., Hassemmer M.P., Borgese L. Chlamydia trachomatis detection in a population of asymptomatic and symptomatic women: correlation with the presence of serological markers for this infection. *New Microbiol.*, 2008, no. 31, pp. 249–256.
17. Miyashita N., Fukano H., Yoshida K., Niki Y., Matsushima T. Chlamydia pneumoniae infection in adult patients with persistent cough. *J. Med. Microbiol.*, 2003, no. 52, pp. 265–269.
18. Neuer A., Lam K.N., Tiller F.W., Kiesel L., Witkin S.S. Humoral immune response to membrane components of Chlamydia trachomatis and expression of the human 60 kDa heat shock protein in follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum. Reprod.*, 1997, vol. 12, no. 5, pp. 925–929.
19. Ondondo B.O., Brunham R.C., Harrison W.G., Kinyari T., Sheth P.M., Mugo N.R., Cohen C.R. Frequency and magnitude of Chlamydia trachomatis elementary body- and heat shock protein 60-stimulated interferon γ responses in peripheral blood mononuclear cells and endometrial biopsy samples from women with high exposure to infection. *J. Infect. Dis.*, 2009, vol. 199, no. 12, pp. 1771–1779. doi: 10.1086/599095
20. Peeling R.W., Bailey R.L., Conway D.J., Holland M.J., Campbell A.E., Jallow O., Whittle H.C., Mabey C.W. Antibody response to the 60-kDa chlamydial heat-shock protein is associated with scarring trachoma. *J. Infect. Dis.*, 1998, vol. 177, no. 1, pp. 256–259. doi: 10.1086/517367
21. Peipert J.F. Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N. Engl. J. Med.*, 2003, vol. 349, no. 25, pp. 2424–2430. doi: 10.1056/NEJMc030542
22. Persson K., Boman J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by Chlamydia pneumoniae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 5, pp. 739–740.
23. Rank R.G., Yeruva L. Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 4, pp. 1362–1371. doi: 10.1128/IAI.01244-13

24. Schachter J., Moncada J., Liska S., Shayevich C., Klausner J.D. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. *Sex. Transm. Dis.*, 2008, vol. 35, no. 7, pp. 637–642. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31817bdd7e
25. Seraceni S., De Seta F., Colli C., Del Savio R., Pesel G., Zanin V., D'Agaro P., Contini C., Comar M. High prevalence of HPV multiple genotypes in women with persistent chlamydia trachomatis infection. *Infect. Agent. Cancer*, 2014, vol. 9: 30. doi: 10.1186/1750-9378-9-30
26. Skilton R.J., Cutcliffen L.T., Barlow D., Wang Y., Salim O., Lambden P.R., Clarke I.N. Penicillin induced persistence in Chlamydia trachomatis: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 11: e7723. doi: 10.1371/journal.pone.0007723
27. Smith-Norowitz T.A., Chotikanatis K., Erstein D.P., Perlman J., Norowitz Y.M., Joks R., Durkin H.G., Hammerschlag M.R., Kohlhoff S. Chlamydia pneumoniae enhances the Th2 profile of stimulated peripheral blood mononuclear cells from asthmatic patients. *Hum. Immunol.*, 2016, vol. 77, no. 5, pp. 382–388. doi: 10.1016/j.humimm.2016.02.010
28. Tiitinen A., Surcel H.M., Halttunen M., Birkelund S., Bloigu A., Christiansen G., Koskela P., Morrison S.G., Morrison R.P., Paavonen J. Chlamydia trachomatis and chlamydial heat shock protein 60-specific antibody and cell-mediated responses predict tubal factor infertility. *Hum. Reprod.*, 2006, vol. 21, no. 6, pp. 1533–1538. doi: 10.1093/humrep/del014
29. Zigangirova N.A., Rummyantseva Y.P., Morgunova E.Y., Kapotina L.N., Didenko L.V., Kost E.A., Koroleva E.A., Bashmakov Y.K., Petyaev I.M. Detection of C. trachomatis in the serum of the patients with urogenital chlamydia. *Biomed. Res. Int.*, 2013, 7 p. doi: 10.1155/2013/489489

Авторы:

Бондарева Н.Е., научный сотрудник лаборатории хламидиоза отдела медицинской микробиологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Моргунова Е.Ю., научный сотрудник лаборатории хламидиозов отдела медицинской микробиологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Зигангирова Н.А., д.б.н., профессор, руководитель отдела медицинской микробиологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Шапкин Ю.Г., д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, зав. кафедрой общей хирургии ФГБУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, г. Саратов, Россия;

Чалык Ю.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры общей хирургии ФГБУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, г. Саратов, Россия;

Чалык Р.Ю., к.м.н., врач ГУЗ Городская клиническая больница № 6 им. академика В.Н. Кошелева, г. Саратов, Россия.

Authors:

Bondareva N.E., Researcher, Laboratory of Chlamydia, Department of Medical Microbiology, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Morgunova E.Yu., Researcher, Laboratory of Chlamydia, Department of Medical Microbiology, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Zigangirova N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of the Department of Medical Microbiology, Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Shapkin Yu.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Physician of the Russian Federation, Head of the Department of General Surgery, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation;

Chalyk Yu.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of General Surgery, Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russian Federation;

Chalyk R.Yu., PhD (Medicine), Physician of Saratov City Clinical Hospital No. 6 named after academician V.N. Koshelev, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 16.10.2017
Отправлена на доработку 18.04.2018
Принята к печати 07.06.2018

Received 16.10.2017
Revision received 18.04.2018
Accepted 07.06.2018

ВИРУС ИСПАНСКОГО ГРИППА: ШТРИХИ К ПОРТРЕТУ СПУСТЯ 100 ЛЕТ

Е.П. Харченко

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

Резюме. Цель исследования состояла в сравнительном анализе молекулярных характеристик генов и белков пандемических штаммов вируса гриппа А для выявления особенностей вируса пандемии испанского гриппа 1918 г. Выявлено, что, в отличие от других пандемических штаммов 1957, 1968, 1977 и 2009 гг., гены вируса испанского гриппа содержат оптимальное количество протяженных комплементарных последовательностей, которые позволяют обеспечить сборку наборов его 8 генов по модели специфического их связывания по единственно возможной схеме и вызывать инфекционный процесс минимальным числом вирионов. Другие пандемические штаммы содержали в своих генах либо избыточное, либо недостаточное количество комплементарных последовательностей, что предполагает сборку набора генов в вирионе по разным моделям, в том числе и по стохастической модели, реализация которой может приводить к образованию потомства в виде роя зависимых от комплементации полуинфекционных вирионов и, соответственно, к уменьшенной их инфекционности. Анализ гена НА вируса испанского гриппа показал исключение из его трансляционного кода квартета триплетов аргинина (CGG, CGA, CGC и CGU), которое строго соблюдается у всех штаммов подтипа H1N1 на протяжении минувшего столетия. Кодирование аргинина в гене НА осуществляется за счет двух других его кодонов: AGG и AGA. Наконец, третья особенность вируса испанского гриппа заключается в принадлежности его NP гена, в отличие от других пандемических штаммов, к птичьему варианту, характеризующемуся более высоким содержанием аргинина и уменьшением числа лизина и адаптированному к повышенной температуре организма птиц. Преобладание аргинина сообщает молекуле NP более высокий положительный заряд за счет его гуанидиновой группировки, обуславливающий более сильное электростатическое взаимодействие с молекулами РНК, и, соответственно, более высокую термостабильность РНП, чем у РНП вирусов гриппа человека. Потенциальным следствием присутствия в вирусе испанского гриппа NP птичьего варианта могла бы быть его высокая патогенность, поскольку лихорадка в организме хозяина создает температурный оптимум для его репликации. Полученные данные по особенностям генома вируса испанского гриппа и другим пандемическим штаммам в сочетании с информацией об особенностях их белков могут быть использованы для прогнозирования предпандемических штаммов и выявления траектории возможной пандемической опасности.

Ключевые слова: компьютерный анализ, испанский грипп, пандемические штаммы, сборка генома, трансляционный код, H1 гемагглютинин, нуклеопротеин.

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

Харченко Е.П. Вирус испанского гриппа: штрихи к портрету спустя 100 лет // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 325–334.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-325-334

Citation:

Kharchenko E.P. The Spanish influenza virus: treats to the portrait after 100 years // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 325–334. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-325-334

THE SPANISH INFLUENZA VIRUS: TREATS TO THE PORTRAIT AFTER 100 YEARS

Kharchenko E.P.

I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The purpose of the study was to compare molecular characteristics of genes and proteins of pandemic influenza strains and find features of the 1918 Spanish influenza virus. Computer analysis has shown that the genes of the Spanish influenza virus in contrast to other pandemic strains contain optimal quantity of long complementary sequences that allow to obtain a supramolecular assembly of 8 virus RNA in according to a model ensuring selective packing of one copy of each virus RNA by the only possible scheme and high transmission to induce infection by single virions. Other pandemic strains contain redundant or insufficient quantity of complementary sequences that allow an assembly of its genome by means of some models including a stochastic one and occurrence of virions with incomplete genome, that is influenza viruses can exist primarily as a swarm of complementation-dependent semi-infectious virions. Analysis of an HA gene of the Spanish influenza virus found out exclusion from its translation code four triplets (CGG, CGA, CGC и CGU) coding arginine. This exclusion is observed in all the H1N1 strains isolated during 100 years. Coding arginine in an HA gene of H1N1 strains is provided by only triplets AGG and AGA. A NP gene of the Spanish influenza virus in contrast to other pandemic strains is avian-like and its NP protein is characterized by elevated quantity of arginine and decreased quantity of lysine that is considered as viral adaptation to avian body temperature. Prevalence of arginine provides more high positive charge for the Spanish influenza NP protein and its more powerful interaction with RNA and consequently more high thermal stability of the its RNP in comparison with the RNP of other pandemic strains. Potential consequence of existence of the avian-like NP in the Spanish influenza virus could be its high pathogenicity as infection fever creates optimal temperature for virus replication. These new data obtained by computer analysis of genomes in the Spanish influenza virus and other pandemic strains (altogether information about its proteins) can potentially be used to track pre-pandemic strains among circulating influenza A viruses and detect the formation of a possible trajectory of pandemic alert.

Key words: *computer analysis, Spanish influenza virus, pandemic influenza strains, genome packing, translation code, H1 hemagglutinin, nucleoprotein.*

Уже 100 лет отделяют нас от разразившейся в 1918 г. пандемии испанского гриппа, унесшей более 50 млн человеческих жизней. По данным ВОЗ, ежегодная смертность от инфекции вирусом гриппа (ВГ) составляет 200 000–500 000 человек. Если ориентироваться на верхнюю границу этой оценки, то за 100 лет из-за гриппа не стало около 100 млн человек.

В поиске подходов распознавания пандемических штаммов (ПШ) ВГ А по молекулярным характеристикам показано, что их внутренние белки [белки полимеразного комплекса (PB1, PB2 и PA), нуклеопротеин (NP), матриксные белки (M1 и M2) и неструктурный белок 2 (NS2)] характеризуются постоянством числа и позиций определенных аминокислот и наличием блоков протяженных инвариантных последовательностей. Выявленные паттерны инвариантности внутренних белков позволяют безошибочно идентифицировать ПШ. Разделенные по их возникновению десятками лет и отличающиеся составом подтипов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА), ПШ имеют сильное сходство по внутренним белкам, образуя особое подмножество, от которого в разной степени «отдалены» неПШ. Это позволяет предположить, что в природе возникновение ПШ вируса гриппа А связано с конвергенцией их внутренних белков к обнаруженным инвариантам пандемичности [2].

Обязательные атрибуты ПШ — высокая трансмиссивность и тяжесть вызываемой ими инфекции. Оба признака определяются сложной совокупностью особенностей генома и кодируемых им продуктов. Перенесенные за 100 лет пандемии существенно отличаются по числу инфицированных людей и смертельных исходов, и вирус испанского гриппа (ВИГ) имеет по этим характеристикам наивысшие, а ПШ 2009–2010 гг. — наименьшие показатели [4]. Представляется естественным сформулировать вопрос: что же отличает ВИГ от виновников последующих пандемий? Последующими ПШ были возникшие вновь реассортантные ВГ А. Важнейшим этапом реассортации (обмена) генов (являющейся наиболее быстрым механизмом изменения генома), как и обычной репродукции ВГ, является процесс упаковки его 8 фрагментов генома в вирион. Однако по прошествии 100 лет механизмы комплектации генома вирионов ВГ по-прежнему остаются невыясненными. В первом приближении можно было бы предположить, что в числе факторов, определяющих трансмиссивность ВГ, не только скорость репликации фрагментов генома и синтеза структурных белков, но и стабильность генов и сборка вирионов, укомплектованных полным набором генов и способных дальше самостоятельно воспроизводиться при инфекции другой особи [8]. Но действительность пред-

ставляется сложнее [3]. Поскольку внутренние белки ПШ имеют тенденцию к конвергенции их первичных структур [2], то для ответа на поставленный вопрос об особенностях ВИГ нами был предпринят сравнительный анализ геномов ПШ, который позволил выявить некоторые существенные отличия ВИГ от других ПШ, потенциально способные влиять на трансмиссивность и патогенность. Их описание является предметом данного сообщения.

Материалы и методы

Для сравнительного компьютерного анализа были использованы штаммы A/Brevig Mission/1/18 (ПШ1918), H2N2 A/Japan/305/1957 (ПШ1957), H3N2 A/AICHI/2/1968 (ПШ1968), H1N1 A/USSR/90/1977 (ПШ1977), H1N1 A/California/04/2009 (ПШ2009), H5N1 A/Indonesia/5/2005, H7N9A/Fujian/02151/2017, H9N2A/Guangdong/MZ058/2016, H9N2 A/SHANHAI/1/2013, а также Zaire Ebolavirus/H.sapiens-rec/LBR/2014/Makona-L2014 ZsG. Из-за отсутствия полных данных по первичной структуре гена НА для ПШ1918 анализ НА проводился по данным для H1N1 A/SouthCarolina/1/18. Помимо перечисленных штаммов при анализе трансляционного кода (ТК) НА были использованы более 100 других выделенных в разные годы штаммов подтипа H1N1. С помощью компьютерного анализа в РНК всех штаммов ВГ выявляли комплементарные последовательности (КП) и аутоКП. Для всех белков каждого ПШ определяли ТК, а для ПШ и птичьих штаммов по белку NP выполнен сравнительный анализ аминокислотного состава*. Источником первичных структур белков и генов анализированных вирусных штаммов служили общедоступные в Интернете базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> и GenBank).

Результаты

Как показано многими исследователями, важную роль в селективности упаковки фрагментов генома ВГ играют комплементарные взаимодействия между РНК в рибонуклеопротеинах (РНП), особенно те, что реализуются комплементарными последовательностями (КП), находящимися в пределах рамок считывания [6]. Для более полного выяснения роли изби-

Таблица 1. Комплементарные последовательности между генами A/BrevigMission/1/18

Table 1. Complementary sequences between the A/BrevigMission/1/18 gene segments

TGCATCCTGTGCAGCAA	PA	(1413–1429)
ACGTAGGACAGGTCGTT	NA	(239–224)
AATTCAGTGGTCCACAG	PB2	(1683–1698)
TGAAGTCAACCAGTGTC	M1	(424–410)
TTGATTTCAGCTGATA	PB2	(1141–1155)
AACTAAGTCGACTCT	PA	(1986–1973)
TCTTCAATCTTCTGA	PB1	(1320–1334)
AGAAGTTTGAAGACT	NS	(695–682)
ACATTCATCTATTTC	HA	(1010–1024)
TGAAAGGTAGATAAG	NP	(309–296)
CTTGGGACATTTGA	PB2	(1819–1832)
GAAACCTGTAAACT	PA	(753–741)
CTGTTCCACCATTG	PB1	(2238–2251)
GACAAGGTAGTAAC	NA	(996–984)
GATCTTATTTCTTC	NP	(1454–1467)
GTAGAATAAAGAAG	NS	(704–692)
ATGCAACTTCAGTG	NA	(236–249)
TACGGTGAAGTCAAC	M1	(429–417)

рательного связывания 8 генов в геном был выполнен поиск полного набора КП между разными генами для каждого штамма, включенного в исследование.

Анализ распространенности наибольшей длины КП среди генов одного и того же штамма ВГ показал, что у 5 ПШ и 3 птичьих исследованных штаммов полностью КП (пКП) длиной в 13 нуклеотидов (н.) почти не встречаются (только одна у ПШ1918), редкими являются пКП в 12 н. У многих генов, но не у всех, имеются пКП в 11 н., и очень частыми для всех подтипов ВГ являются пКП в 10 н. Но часто встречающиеся пКП создадут помехи для комплектования полноценного генома с 8 разными генами, благоприятствуя образованию преимущественно дефектных вирионов. Принять 11 н. в качестве минимальной длины пКП нельзя по той причине, что в разных белках часто встречается идентичные тетрапептиды, и если бы комплементарное узнавание РНК осуществлялось по 10–11 н., то в клетках происходило бы очень частое комплексование разных мРНК. Идентичные же пентапептиды в разных белках встречаются весьма редко, поэтому нижнее значение длины для КП можно было бы принять за 14–15 н., но такие для генов ВГ, как отмечено выше, практически не встречаются. Однако комплементарное узнавание может быть реализовано, если допустить, что связность генов обеспечи-

* В статье используется международный код аминокислот: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, E — глутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин. Для обозначения нуклеиновых оснований используется следующая аббревиатура: А — аденин, Г — гуанин, Ц — цитозин, Т — тимин.

Таблица 2. Распределение аутокомплементарных последовательностей среди генов разных штаммов вируса гриппа

Figure 2. Distribution of the autocomplementary sequences amongst the genes of various influenza virus strains

Гены Genes	ПШ1918 PS1918	ПШ1957 PS1957	ПШ1968 PS1968	ПШ1977 PS1977	ПШ2009 PS2009	H5N1*	H7N9*	H9N2*
PB2	4	0	0	0	0	0	0	0
PB1	8	0	0	0	2	10	8	8
PA	6	2	2	2	0	6	6	4
HA	4	0	0	0	6	0	6	12
NP	12	6	6	12	4	0	4	6
NA	2	0	0	0	6	0	0	0
M1	0	0	0	0	0	4	0	0
NS	0	0	0	0	0	0	2	2

Примечания: * соответственно штаммы H5N1 A/Indonesia/5/2005, H7N9 A/Fujian/02151/2017 и H9N2 A/Guangdong/MZ058/2016.

ПШ — пандемический штамм.

Notes: * correspondingly H5N1 A/Indonesia/5/2005, H7N9 A/Fujian/02151/2017 and H9N2 A/Guangdong/MZ058/2016 strains. PS — pandemic strain.

ваются более длинными, но не полностью КП (нпКП), содержащими по одному некомплементарному нуклеотиду. Анализ показал, что лишь 5 штаммов из 10 исследованных содержали от 1 до 3 нпКП длиной в 16 н., нпКП длиной в 15 н. встречались (в количестве от 1 до 9) среди генов 6 из 8 штаммов, что также явно недостаточно для обеспечения полной связности всех генов у каждого штамма. Примечательно, что они отсутствовали у ПШ2009, а их максимальное число, по сравнению с другими, было у ПШ1918. С нпКП длиной в 14 н. связными оказываются лишь геномы ПШ1918 и ПШ1957. Полный перечень нпКП длиной от 17 до 14 н. в генах ПШ1918 представлен в табл. 1, а на рисунке Д изображен единственно возможный граф их связности. Среди других пандемических штаммов ПШ1918 первенствует по длине и оптимальному числу нпКП, Кроме того, в ге-

нах ПШ1918, по сравнению с другими штаммами, существенно выше содержание полностью аутоКП длиной в 11 н. (табл. 2), что может обеспечить им большую стабильность как при входе вириона в цитоплазму клетки при ее инфицировании, так и при завершении репликации вируса.

По сравнению с ПШ1918 у ПШ1957 не 8, а 10 нпКП между генами, и это количество уже не является оптимальным для формирования набора из 8 разных генов по двум причинам. В частности, PB2 и PB1 имеют нпКП более чем к 2 генам, что приводит к конкуренции между ними за связывание с другими генами и формированию комплексов с уменьшенным набором генов. Вторая причина связана с наличием у генов PB2 и PA двух нпКП друг к другу, что может приводить к формированию ансамблей генов, содержащих дубли одного и того же

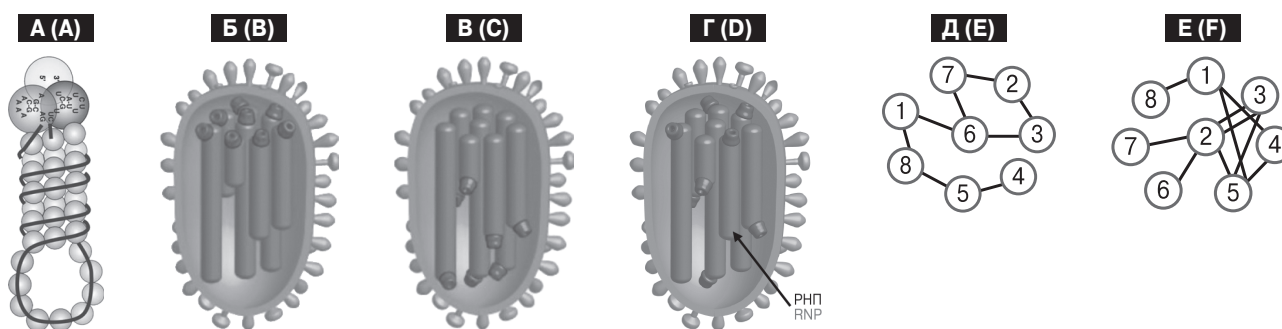


Рисунок. Модели упаковки РНП в вирионах вируса гриппа

Figure. RNP packaging models in influenza virus virions

Примечания: А — модель РНП; В, С и D — варианты упаковки набора 8 РНП в вирионе; Д и Е модели — графы связности РНП для 8 генов соответственно для ПШ1918 и ПШ1957, в которых 1 — PB2, 2 — PB1, 3 — PA, 4 — HA, 5 — NP, 6 — NA, 7 — M1 и 8 — NS.

Notes: A — model of the RNP; B, C and D are variants of the packaging of the set of 8 RNP in the virion; E and F models are the RNP connectivity graphs for 8 genes for PS1918 and PS1957, respectively, in which 1 — PB2, 2 — PB1, 3 — PA, 4 — NA, 5 — NP, 6 — NA, 7 — M1 and 8 — NS.

гена либо состоящие только из цепи этих двух генов. На рисунке Е для ПШ1957 представлен лишь один из возможных графов укладки, обеспечивающий связность 8 разных генов. Обе отмеченные причины возникновения помех при избыточном количестве КП между одними и теми же парами генов особенно вероятны в случае ПШ1968, у которого 15 нпКП между генами. Примечательно, что при этой избыточности нпКП ген М1 оказывается вне связности с другими генами. По тем же упомянутым причинам, но при наличии 8 нпКП вне связности оказывается ген М1 у ПШ1977, а у ПШ2009 с 7 нпКП — вне связности ген NS.

Сравнение ТК генов у разных штаммов выявило у всех представителей подтипа Н1N1 общую особенность гена Н1. Она заключается в элиминации из ТК (табл. 3) квартета триплетов, кодирующих аргинин (CGA, CGG, CGC и CGT). С целью подтверждения этой уникальности ТК гена Н1 нами были проанализированы более сотни штаммов Н1N1, выделенных в течение столетия, и отклонений от этой консервативной характеристики Н1 не выявлено. Сопоставление ТК Н1 штаммов A/South Carolina/1/1918 и ПШ2009 свидетельствует не только о сохранении у них общей уникальности по кодированию аргинина, но и о близости по численным пропорциям использования триплетов остальных аминокислот. В частности, по подавляющему большинству аминокислот отмечается предпочтительное использование триплетов с максимальным содержанием аденина и/или тимина (урацила) с явной тенденцией наименьшего вовлечения триплетов с максимальным содержанием в них гуанина и/или цитозина.

Помимо гена Н1, в штаммах ПШ1918 и ПШ2009 исключение кодонов отмечается в генах NA и NS. Они характеризуются разным составом элиминированных кодонов, которые затрагивают не только аргинин, но и другие аминокислоты. В гене NP ПШ1918 и гене М1 ПШ2009 исключены по одному из триплетов, кодирующих соответственно лейцин и аланин. Для других подтипов NA свойственна иная картина исключения триплетов из ТК. У NA H5N1 A/Indonesia/5/2005 по аргинину исключены триплеты CGG, CGC и CGT, а также триплет GGC по глицину, а у H9N2 A/Shanghai/1/2013 по аргинину исключены триплеты CGC и CGT, а также триплет GCG по аланину. В NA ПШ1968 не используется триплет CGT, а у ПШ1957 3 триплета аргинина — CGT, CGC и CGA. О распространенности исключения триплетов из ТК свидетельствует анализ генов ВГ В и мононэгавирусов (например, у вируса Эбола). Таким образом, элиминация из ТК генов триплетов разных аминокислот, в том числе и триплетов аргинина, не является привилегией только ВГ подтипа Н1N1, но полная элиминация из ТК квартета триплетов одного и того же корня для аргинина, сохраняющаяся, по-видимому, более 100 лет, свойственна лишь для NA у ВГ подтипа Н1N1.

NP белок обеспечивает упаковку РНК в РНП, формируя остов, вокруг которого обвивается двойная спиральная структура РНК с антипараллельными ветвями (рис., А), при этом фосфатные группы РНК взаимодействуют с NP, а нуклеотидные основания экспонированы наружу. Априорно конформация фрагмента РНК в РНП будет определяться пространственной укладкой NP и составом его основных

Таблица 3. Трансляционный код гемагглютининов Н1N1 пандемических штаммов

Table 3. The translation code of the H1N1 pandemic strain hemagglutinins

A/South Carolina/1/1918					A/California/04/2009										
TCT S	7	TGT C	10	TTT F	9	TAT Y	17	TCT S	8	TGT C	9	TTT F	8	TAT Y	13
TCC S	6	TGC C	6	TTC F	10	TAC Y	9	TCC S	4	TGC C	6	TTC F	11	TAC Y	14
TCA S	16	TGA Z	1	TTA L	11	TAA Z	0	TCA S	18	TGA Z	0	TTA L	5	TAA Z	1
TCG S	3	TGG W	11	TTG L	9	TAG Z	0	TCG S	1	TGG W	10	TTG L	10	TAG Z	0
ACT T	7	AGT S	6	ATT I	10	AAT N	26	ACT T	9	AGT S	7	ATT I	18	AAT N	27
ACC T	8	AGC S	11	ATC I	8	AAC N	16	ACC T	2	AGC S	9	ATC I	7	AAC N	14
ACA T	20	AGA R	12	ATA I	14	AAA K	21	ACA T	23	AGA R	14	ATA I	12	AAA K	27
ACG T	2	AGG R	8	ATG M	8	AAG K	12	ACG T	3	AGG R	4	ATG M	7	AAG K	15
CCT P	2	CGT R	0	CTT L	2	CAT H	10	CCT P	2	CGT R	0	CTT L	1	CAT H	8
CCC P	5	CGC R	0	CTC L	6	CAC H	3	CCC P	4	CGC R	0	CTC L	5	CAC H	7
CCA P	9	CGA R	0	CTA L	9	CAA Q	10	CCA P	9	CGA R	0	CTA L	15	CAA Q	7
CCG P	3	CGG R	0	CTG L	14	CAG Q	7	CCG P	5	CGG R	0	ATG L	10	CAG Q	8
GCT A	6	GGT G	10	GTT V	5	GAT D	15	GCT A	5	GGT G	9	GTT V	7	GAT D	13
GCC A	7	GGC G	2	GTC V	9	GAC D	10	GCC A	9	GGC G	4	GTC V	5	GAC D	13
GCA A	18	GGA G	22	GTA V	9	GAA E	26	GCA A	17	GGA G	13	GTA V	17	GAA E	24
GCG A	6	GGG G	10	GTG V	9	GAG E	9	GCG A	2	GGG G	14	GTG V	7	GAG E	11

аминокислот (лизина, аргинина и гистидина). Хотя все структурные белки ВГ А, по сравнению с поверхностными белками НА и NA, характеризуются выраженной эволюционной консервативностью, у NP птичьих штаммов следует ожидать некоторые особенности. Более высокая температура тела птиц, по сравнению с человеком, должна бы влиять на прочность комплекса РНК-NP, и одним из молекулярных механизмов адаптации ВГ в организме птиц могло бы быть изменение состава основных аминокислот, в частности аргинина и лизина, имеющих существенно отличные потенциалы ионизации и, соответственно, разную силу взаимодействия с фосфатными группировками РНК в составе РНП.

Сравнительный анализ аминокислотного состава NP у ПШ ВГ и у птичьих штаммов выявил (табл. 4), что ПШ1918, в отличие от других ПШ, содержит NP птичьего типа, а особенностью последнего является измененное соотношение содержания аргинина и лизина: более низкое содержание лизина и повышенное содержание аргинина при практически неизменном количественном соотношении дикарбоновых аминокислот — аспарагиновой и глутаминовой.

В других белках (даже в PB1, PB2 и PA, отличающихся противоположной по суммарному заряду полярностью) птичьих и человеческих штаммов ВГ таких сдвигов в содержании основных аминокислот не выявлено. Аргинин по своим размерам значительно больше лизина и имеет гуанидиновый радикал с более мощным ионизационным потенциалом, чем NH₂-группа у лизина. Поэтому повышение содержания аргинина может быть существенным фактором в повышенной термостабильности РНП у ВГ птичьего происхождения.

Обсуждение

Выполненный компьютерный анализ геномов и белков ПШ позволил дополнить «портрет» ВИГ тремя новыми «штрихами»: 1) его гены содержат более протяженные (и оптимальные по количеству) нпКП, потенциально способные участвовать в комплектации полного на-

бора 8 генов; 2) в нуклеотидной последовательности НА гена исключен из ТК квартет триплетов аргинина, что оказалось консервативным признаком для всех ВГ подтипа H1N1; 3) NP ВИГ, в отличие от других ПШ, принадлежит к птичьему варианту, для которого характерно иное соотношения аргинина и лизина. Каждая из этих характеристик потенциально способна влиять на различные уровни репликации ВИГ в организме хозяина, преломляясь и в механизмах патогенности.

Комплементарные последовательности и упаковка генома. Исторически объяснение механизма упаковки 8 фрагментов генома в состав вириона ВГ основывалось на двух гипотезах. Согласно первой комплектование генов является случайным процессом [7]. Но по элементарным математическим расчетам по стохастической модели при инфекционном процессе возможно образование лишь 0,4% вирионов с полным комплектом генов и способных соответственно быть самостоятельно инфекционными. По второй гипотезе, процесс упаковки генов характеризуется селективностью, обеспечиваемой совокупностью сигналов взаимного узнавания генов — содержащимися в них КП. В качестве таких сигналов, как показано экспериментально, служат не только концевые последовательности, фланкирующие открытую рамку считывания генов, но и последовательности в пределах рамки считывания [6], что заметно усилило аргументацию в пользу гипотезы селективного комплектования генов в вирионы ВГ. Однако существование множества подтипов ВГ, огромная численность штаммов и распространенность реассортации между разными подтипами ВГ практически исключают возможность существования универсальной сети сигналов распознавания РНП в процессе упаковки генома.

Трехмерный анализ комплексов РНП выявил несколько вариантов их взаимного расположения в вирионе по модели «7+1» (рис., Б, В, Г) — группирование по окружности в разных сочетаниях 7 генов вокруг центрально расположенного гена [10], которую условно можно обозначить как «моновирионную» модель,

Таблица 4. Аминокислотный состав нуклеопротеинов разных подтипов вируса гриппа

Figure 4. Amino acid compositions in the nucleoproteins of various influenza virus subtypes

	K	R	H	D	E	P	C	L	I	V	A	Y	W	F	G	M	N	Q	S	T
H1N1 A/Brevig Mission/1/18	16	54	6	22	37	17	6	30	31	22	39	15	6	17	41	25	25	21	40	28
H2N2 A/Japan/305/1957	24	46	5	24	35	18	6	31	28	23	39	15	6	17	42	25	28	21	38	27
H3N2 A/AICHI/2/1968	23	48	5	24	36	18	6	32	27	22	41	15	6	17	40	26	27	21	39	25
H1N1 A/USSR/90/1977	23	47	5	23	36	17	6	32	30	22	40	15	6	17	41	24	26	21	39	28
H1N1 A/California/04/2009	21	50	7	23	36	16	6	32	28	26	40	13	6	17	42	23	26	21	40	25
H5N1 A/Indonesia/5/2005	15	55	6	21	37	16	6	32	29	25	39	14	6	18	41	23	28	22	38	27
H7N9 A/Fujian/02151/2017	15	55	6	21	37	16	6	32	29	23	40	13	6	18	41	24	29	22	38	27
H9N2 A/Guangdong/MZ058/2016	14	56	6	21	37	16	6	32	29	24	40	13	6	18	41	23	28	22	39	27

предполагающую упаковку каждого вириона ансамблем всех 8 генов ВГ. Следует заметить, что множественность вариантов комплектования генов по модели «7+1» уже не служит свидетельством строгого детерминирования комплексования генов в вирионах ВГ. Более того, последующее исследование авторов модели «7+1» отдельных вирионов ВГ А и В выявило, что до 20% вирионов (в зависимости от штамма) содержат 5, 6 или 7, а не 8 генов, то есть являются не полностью укомплектованными по генному составу. Авторы, сохраняя приверженность модели селективного комплектования генов, объясняют неполноту состава генома в отдельных вирионах «большой гибкостью процесса упаковки генома, чем предполагалось ранее» [9], не допуская включение в него случайности и игнорируя результаты более раннего исследования [3], в котором уже было показано, что до 90% вирионов ВГ А (в зависимости от штамма) не экспрессируют, по крайней мере, один из главных белков. По мнению авторов [3], следствием легкости реассортации генов между разными штаммами являются трудности в комплектовании полноценных вирионов, и большинство их из-за дефектности способны лишь на один раунд инфекции, не влияя заметно на проявление самого инфекционного процесса. Само же существование ВГ А рассматривается, главным образом, как рой зависимых от комплементации полуинфекционных вирионов и, следовательно, традиционные анализы инфективности ВГ, возможно, сильно искажают истинный инфекционный потенциал вирусной популяции. По существу это означает использование ВГ также популяционной модели генома, которая совершенно не исключает ее сосуществование в природе с моновирионной моделью упаковки генома. Весомой аргументацией в пользу популяционной модели служат данные по морфологии ПШ2009, в частности существование у них палочковидных структур и образования вирионами кластеров [1]. Передача ВГ кластерами позволяет сохранить его контагиозность благодаря возможности реализации комплементации генов, если вирионы содержат неполные наборы генов. Палочковидная форма вирионов хорошо адаптирована к модели сборки генома по варианту рисунка Г, когда полюса РНП, связывающихся через КП в РНК, смещены относительно друг друга, что увеличивает общую длину ансамбля генов, а также устраняет ограничения на позицию КП в РНК и допускает упаковку повторяющихся ансамблей генов. Вариативность морфологии ВГ должна определяться согласованными изменениями в поверхностных белках НА и NA и белками матрикса М1 и М2.

Оба упомянутых исследования [3, 9], как и данные по морфологии ВГ, сильно подрывают аргументацию в пользу существования одной модели упаковки полноценного генома ВГ и скорее свидетельствуют о сосуществовании по крайней мере 2 моделей. Нами впервые специально исследовано распределение КП среди генов разных подтипов ВГ А, которое на примере ПШ и птичьих штаммов показало варьирование их распределения в генах. Число КП в генах штамма может быть оптимальным, недостаточным или избыточным. В случае оптимального количества КП, как это выявлено при моделировании упаковки генома ПШ1918, в вирионе формируется полный набор 8 генов по модели «7+1» либо последовательного связывания генов через КП с образованием завитка, имитирующего модель «7+1». Сама модель «7+1» может допускать несколько сценариев, проиллюстрированных на рисунке (Б, В и Г) [12] и обусловленные тем, в какой ветви «шпильчатой» структуры РНК в РНП (рис., А) и на каком уровне расположены КП в РНП соответствующих пар генов. К примеру, если КП расположены в антипараллельных ветвях РНК в РНП, то их РНП располагаются однонаправленно относительно друг друга, то есть круговые петли их РНП располагаются по одну сторону. Варианты Б и В упаковки РНП на рисунке [12] представляются возможными, но маловероятными (поскольку требуют согласованного позиционирования КП во всех 8 генах ВГ), что аргументируется разными позициями нПКП в генах ПШ1918 (табл. 1) и других ПШ. Реалистичным представляется вариант Г на рисунке, допускающий разнонаправленное расположение РНП и смещение их полюсов. Преимущество существования между генами оптимального количества КП связано с образованием полноценных по набору генов вирионов, способных самостоятельно вызвать инфекционный процесс при заражении хозяина минимальным числом вирионов, то есть одним вирионом.

При избыточном числе КП, как в случае ПШ1957, потенциально возможна реализация нескольких конкурирующих вариантов образования наборов генов. Один из них основан на модели «7+1». Другие реализуются в наборы с разным уменьшенным числом РНП, и, следовательно, часть образующегося потомства — это популяция зависимых от комплементации полуинфекционных вирионов, репликация которых в клетках хозяина будет невозможной при заражении единичным вирионом. Следовательно, инфекционность таких штаммов ВГ будет сильно варьировать и уступать таковой у вирусов с оптимальным числом КП. При недостаточности количества КП между генами (как это характерно для ПШ1968

и ПШ2009), практически все потомство вируса из-за хаотичности в образовании наборов генов представляет собой в разной степени зависимые от комплементации полуинфекционные вирионы. Если обратиться к статистике минувших за столетие пандемий, то в ряду ПШ1918—ПШ1957—ПШ1968—ПШ2009 прослеживается последовательное уменьшение по числу инфицированных людей и смертельных исходов от ПШ1918 к ПШ2009, которое согласуется с особенностями распределения КП в генах этих ПШ и с возможностью существования в природе разных моделей упаковки генома ВГ.

С биологической точки зрения, саму возможность существования двух моделей интеграции генома ВГ можно рассматривать как проявление вырожденности механизма интеграции генов, и они не исключают друг друга. Вырожденность функции (или механизма) предполагает существование нескольких путей ее (его) реализации, при этом возможно вовлечение разных участников. Классическим примером вырожденности функции служит генетический код, в котором кодирование одной и той же аминокислоты представлено разными кодонами — от одного до шести. Если оценивать обе модели интеграции генома ВГ, то популяционная модель интеграции генома в аспекте воспроизведения/выживания потомства обладает преимуществом, поскольку предоставляет широкий выбор в комплекции вирионов генами при инфекционном процессе и меньшей чувствительностью к мутационным дефектам генов. При моновирионной модели интеграции генома преимущество самостоятельного воспроизведения каждым вирионом может быть утрачено в результате быстрого накопления в генах мутаций, не совместимых с воспроизведением потомства, например, из-за изменений в самих КП, приводящих к утрате «узнавания» генов друг другом, необходимого для формирования ансамбля из 8 разных генов.

Особенности трансляционного кода. Нет оснований объяснять особенности ТК гена Н1 различиями в организации генома и трансляционного механизма между хозяином и ВГ, поскольку исключение каких-либо кодонов отсутствует в генах полимеразного комплекса ВГ, трансляция которых вместе с мРНК остальных белков происходит в одном и том же клеточном компартменте, что отвергает, соответственно, предположение о детерминации элиминации триплетов из РНК Н1 недостаточной концентрацией загруженных аминокислотами тРНК в клеточном пуле. Возможно, что феномен исключения из ТК гена Н1 квартета триплетов аргинина связан с обеспечением поверхностными белками ВГ адаптивной изменчивости, но он не распространяется на ген NA и на другие

подтипы NA. Из-за постоянства проявления на протяжении 100 лет в громадном множестве штаммов подтипа H1N1 мало оснований полагать, что этот феномен является случайным по своей природе. Он не связан с функционированием самого белка NA (так как аргинин в генетическом коде представлен 6 триплетами и не исключен из самого NA за счет кодирования его двумя другими триплетами — AGG и AGA) и остается пока не объяснимым.

Особенности NP. Среди ограничений, налагаемых на трансмиссивность вирусных реассортантов, можно особенно выделить температурный фактор, поскольку тройка хозяев (птицы, свинья и человек) штаммов ВГ существенно контрастирует по температуре их тела. В жизненном цикле ВГ температуро- и pH-зависимыми являются конформационные изменения NA и процесс слияния оболочки вируса с эндосомальной мембраной [5, 11]. Другое ограничение должно быть связано с NP, так как прочность взаимодействия NP с вирусной РНК в РНП будет определяться, помимо особенностей структуры белка NP, температурой тела хозяина ВГ.

Априорно можно полагать, что процессы репликации и транскрипции, сопряженные с диссоцированием NP от РНК, имеют температурный оптимум, детерминированный температурой тела конкретного вида животного, под которую адаптирован аминокислотный состав NP циркулирующего в нем штамма ВГ. У человека температура тела равна 36,6°C, у свиней — 38–40°C, а у птиц — 42,5°C. Столь существенная разница температур тела птиц и человека должна обязательно отразиться на аминокислотном составе NP их ВГ, в частности на содержании в них положительно заряженных аргинина и лизина, так как через эти аминокислоты осуществляется электростатическое (наиболее сильное) взаимодействие NP с фосфатными радикалами геномной РНК в вирионе, и от силы этого взаимодействия будут зависеть скорость репликации и транскрипции и прежде всего возможность их самой реализации. Для NP у ВГ птиц должна быть характерна по крайней мере более высокая, по сравнению с ВГ человека, положительная заряженность, что и проявляется в более повышенном содержании у них аргинина (табл. 4). Преобладание аргинина сообщает за счет его гуанидиновой группировки молекуле NP более высокий положительный заряд. Это обуславливает более сильное электростатическое взаимодействие с молекулами РНК, и, соответственно, более высокую термостабильность, чем в NP у ВГ человека. Особенности эволюции NP, являющегося высококонсервативным белком, проявляются преимущественно в синонимичных заменах заряженных аминокислот. При не-

изменности сумм соответственно положительно (лизина, аргинина, гистидина) и отрицательно (глутаминовой и аспарагиновой кислот) заряженных аминокислот и постоянстве их положения в первичной структуре при адаптации к тому или иному виду менялись количественные соотношения в парах лизин/аргинин и глутаминовая кислота/аспарагиновая кислота, независимо от подтипа их HA и NA. У всех ВГ в NP содержание аргинина значительно выше, чем лизина.

По-видимому, реассортанты ВГ птиц с воспринятым NP геном от ВГ человека будут резко ограничены в распространении среди птиц, но потенциально способны циркулировать в человеческой популяции при условии функциональной совместимости NP гена (белка) с другими генами (белками) самого ВГ и хозяина. Для реассортанта, сочетающего птичий NP и остальные гены от ВГ человека, неоптимальными будут условия репликации до подъема температуры у зараженного им субъекта, но повышение температуры у него при развитии инфекции окажется благом для репликации такого реассортанта и еще большим отягощением состоянием зараженного субъекта. Возможно, что присутствие в ПШ1918 NP гена птичьего происхождения (предполагается, что ПШ1918 полностью птичьего происхождения [14]) внесло также свой вклад в особенно высокую его патогенность. В этой связи примечательным представляется сопоставление ПШ1918, ПШ2009 и современных птичьих штаммов H5N1, H7N9 и H9N2 по трансмиссивности и патогенности для человека. Птичьим штаммам свойственна слабая трансмиссивность среди людей, но они

вызывают высокую смертность в случае инфицирования. Для ПШ1918 и ПШ2009 свойственна высокая трансмиссивность, объясняемая их принадлежность обоим к подтипу H1N1, но они сильно различаются по вызываемому ими уровню смертности. Сходны ПШ1918 и птичий ВГ по вызываемой ими высокой смертности и содержанию птичьего NP. При анализе факторов, обуславливающих патогенность ВГ, и конструировании живых вакцинных штаммов нельзя, по-видимому, игнорировать природу NP-гена.

В завершение хотелось бы подчеркнуть, что благодаря целеустремленности исследователей и развитию методов науки в период 1995–2005 гг. были воссозданы гены ВИГ [13], что явилось блестящим вкладом в вирусологию и открыло возможность заглянуть в прошлое — в истоки одной из наиболее опустошительных пандемий гриппа в современной истории человечества. Помимо ранее известных данных о различиях между ВИГ и ПШ2009 (одиночные мутации в разных генах, наличие стоп-кодонов в белке PB1-F2 или COOH-концевая делеция в NS1 белке [1]), выявленные нами данные по КП в генах ВИГ, как и особенности его NP и HA, дополняют описание его «портрета» и углубляют молекулярную интерпретацию его непревзойденных другими ПШ трансмиссивность и патогенность для человека. В сочетании с информацией по особенностям белков ПШ [2] новые данные по анализу геномов ПШ расширяют возможности выявления и отслеживания предПШ и прогнозирования формирования пандемической опасности и могут быть полезными для конструирования новых вакцин.

Список литературы/References

1. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1V-2009. СПб.—М.: Компания «Димитрейд График Групп», 2011. 163 с. [Kiselev O.I. Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1V-2009. [The genome of pandemic influenza virus A/H1N1V-2009]. St. Petersburg—Moscow: Dimitrade Grafic Group, 2011. 163 p.]
2. Харченко Е.П. Инвариантные паттерны внутренних белков пандемических вирусов гриппа // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 323–330. [Kharchenko E.P. The invariant patterns of the internal proteins of pandemic influenza viruses. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 323–330. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-323-330 (In Russ.)]
3. Brooke C.B., Ince W.L., Wrammert J., Ahmed R., Wilson P.C., Bennink J.R., Yewdel J.W. Most influenza A virions fail to express at least one essential viral protein. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 6, pp. 3155–3162. doi: 10.1128/JVI.02284-12
4. Chan M. Statement to press by director — general of the World Health Organization 11 June 2009. World now at the start of 2009 influenza pandemic.
5. Daniels R.S., Downie J.C., Hay A.J., Knossow M., Skehel J.J., Wang M.L., Wiley D.C. Fusion mutants of the influenza virus hemagglutinin glycoprotein. *Cell*, 1985, vol. 40, no. 2, pp. 431–439.
6. Gerber M., Isel C., Moules V., Marquet R. Selective packaging of the influenza A genome and consequences for genetic reassortment. *Trends Microbiol.*, 2014, vol. 22, no. 8, pp. 446–455. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.001
7. Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, pt. 2, pp. 313–328. doi: 10.1099/vir.0.017608-0
8. Lakdawala S.S., Fodor E., Subbarao K. Moving on out: transport and packaging of influenza viral RNA into virions. *Annu. Rev. Virol.*, 2016, vol. 3, pp. 411–427. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042345
9. Nakatsu S., Sagara H., Sakai-Tagawa Y., Sugaya N., Noda T., Kawaoka Y. Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. *MBio*, 2016, vol. 7(5). pp. e01248-16. doi: 10.1128/mBio.01248-16

10. Noda T., Sugita Y., Aoyama K., Hirase A., Kawakami E., Miyazawa A., Sagara H., Kawaoka Y. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat. Commun.*, 2012, vol. 3: 639. doi: 10.1038/ncomms1647
11. Skehel J.J., Bayley P.M., Brown E.B., Martin S.R., Waterfield M.D., White J.M., Wilson I.A., Wiley D.C. Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, no. 4, pp. 968–972.
12. Sugita Y., Sagara H., Noda T., Kawaoka Y. The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. *J. Virol.*, 2013, vol. 87, no. 23, pp. 12879–12884. doi: 10.1128/JVI.02096-13
13. Taubenberger J.K., Hultin J.V., Morens D.M. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antivir. Ther.*, 2007, vol. 12, no. 4, pt. B, pp. 581–591.
14. Taubenberger J.K., Reid A.H., Lourens R.M., Wang R., Jin G., Fannin T.G. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, 2005, vol. 437, no. 7060, pp. 889–893.

Автор:

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

Author:

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

Поступила в редакцию 18.10.2017
Принята к печати 13.06.2018

Received 18.10.2017
Accepted 13.06.2018

ИММУННАЯ ПРОСЛОЙКА К ВИРУСУ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА У НАСЕЛЕНИЯ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ

А.О. Туранов¹, А.Я. Никитин², Е.И. Андаев²

¹ ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае Роспотребнадзора, г. Чита, Россия

² ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия

Резюме. В работе приведены данные по изучению величины иммунной прослойки к вирусу клещевого энцефалита у населения Забайкальского края, сложившейся в результате естественной иммунизации здорового населения 31 муниципального района в 2011–2016 гг. Выборки людей формировались пропорционально численности населения в конкретном населенном пункте среди лиц различных возрастных и профессиональных групп, проживающих на территории не менее 10 лет, не привитых против клещевого вирусного энцефалита. Всего исследовано 4367 сывороток крови. Лабораторное исследование на наличие антител класса G к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках крови населения проводили в ИФА с использованием набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Результаты мониторинга свидетельствуют о наличии естественного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита у населения. Среднемноголетний уровень иммунной прослойки в муниципальных районах варьирует от 3,1 до 52,7% (в Забайкальском крае — 13,1±0,51%). Высокий уровень — от 20 до 52,7% характерен для горно-таежно-лесостепной зоны (Красночикойский — 23,8±3,36%; Улетовский — 52,4±4,48%; Газимуро-Заводский — 29,4±4,94% районы), горно-тундрово-таежной зоны (Тунгокоченский район — 20,0±3,58%). В степной зоне уровень иммунной прослойки ниже и наблюдается в районах, где встречаются элементы южно-таежных лиственных и сосновых лесов. Установлено, что уровни иммунной прослойки населения, проживающего в горно-таежно-лесостепной и горно-тундрово-таежной зонах достоверно выше, чем в степной — $t = 3,8$; $P < 0,001$ и $t = 2,27$; $P < 0,05$ соответственно. Различия в величине иммунной прослойки между горно-тундрово-таежной и горно-таежно-лесостепной зонами не достоверны: $t = 0,1$; $P > 0,05$. Активная циркуляция вируса клещевого энцефалита сопровождалась достоверным ($P < 0,01$) увеличением прослойки лиц с антителами к вирусу в 2014–2016 гг. (15,8±0,69%) по сравнению с 2011–2013 гг. (9,7±0,78%). Причем отмечено это во всех ландшафтных зонах: в степной рост на 42,8% ($P > 0,05$); в горно-таежно-лесостепной — на 61,3% ($P > 0,05$); в горно-тундрово-таежной на 150,0% ($P < 0,01$). Корреляцию между обращаемостью и величиной иммунной прослойки среди населения, образованной в результате латентной иммунизации, выявить не удалось. Результаты изучения популяционного иммунитета населения существенно дополняют наши представления о состоянии природных очагов и динамики развития эпидемических процессов, происходящих в них, и могут быть использованы при планировании профилактических мероприятий.

Ключевые слова: клещевой вирусный энцефалит, иммунная прослойка, иммуноферментный анализ, природный очаг.

Адрес для переписки:

Туранов Александр Олегович
672000, Россия, г. Чита, ул. Ленинградская, 70, а/я 900,
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае».
Тел.: 8 (3022) 35-93-23 (служебн.).
Факс: 8 (3022) 35-93-23.
E-mail: cge@megalink.ru

Contacts:

Aleksandr O. Turanov
672000, Russian Federation, Chita, Leningrad str., 70/900,
Center of Hygiene and Epidemiology in Transbaikalia Territory.
Phone: +7 (3022) 35-93-23 (office).
Fax: +7 (3022) 35-93-23.
E-mail: cge@megalink.ru

Библиографическое описание:

Туранов А.О., Никитин А.Я., Андаев Е.И. Иммунная прослойка к вирусу клещевого энцефалита у населения Забайкальского края как показатель активности природных очагов // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 335–340. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-335-340

Citation:

Turanov A.O., Andaev E.I., Nikitin A.Ya. Immune interlayer to tick-borne encephalitis virus in human population of transbaikalia as an indicator of natural foci activity // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 335–340. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-335-340

IMMUNE INTERLAYER TO TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN HUMAN POPULATION OF TRANSBAIKALIA AS AN INDICATOR OF NATURAL FOCI ACTIVITY

Turanov A.O.^a, Nikitin A.Y.^b, Andaev E.I.^b

^a Center of Hygiene and Epidemiology in Transbaikalian Territory of Rospotrebnadzor, Chita, Russian Federation

^b Irkutsk Antiplague Research Institute, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Studying of immune interlayer value to tick-borne encephalitis virus in human population of the Transbaikalia Territory resulted from natural immunization of the healthy population in 31 Municipal areas in 2011–2016 is presented. Human selections were formed proportionally to the population size in the concrete human settlement among persons of the various age and professional groups living at this territory not less than 10 years and unvaccinated against tick-borne encephalitis virus. Total 4367 blood sera were investigated. Laboratory testing for antibodies of G class to tick-borne encephalitis virus in blood sera of the human population was performed by immune-enzyme analysis using a set of reagents “VektoVKE-IgG” of Joint-Stock Company “Vektor-Best” (Novosibirsk city). The monitoring data indicated the presence of natural immunity to tick-borne encephalitis virus in the human population. Mean annual level of immune interlayer in Municipal areas varied from 3.1 to 52.7% (in Transbaikalian Territory — $13.1 \pm 0.51\%$). High level (from 20 to 52.7%) was characteristic for mountain-taiga-forest-steppe zone (Krasnochikoisky — $23.8 \pm 3.36\%$; Uletovsky — $52.4 \pm 4.48\%$; Gazimuro-Zavodsky — $29.4 \pm 4.94\%$ districts) and mountain-tundra-taiga zone (Tungokochensky district — $20.0 \pm 3.58\%$). In steppe zone the level of immune interlayer was lower and observed in districts with elements of south-taiga larch and pine forests. It was established that levels of the immune interlayer in human population living in mountain-taiga-forest-steppe and mountain-tundra-taiga zones authentically higher than in steppe area — $t = 3.8$; $P < 0.001$ and $t = 2.27$; $P < 0.05$, respectively. Distinctions in the value of the immune interlayer between mountain-tundra-taiga and mountain-taiga-forest-steppe zones were non-authentic: $t = 0.1$; $P > 0.05$. Active circulation of tick-borne encephalitis virus was accompanied by authentic ($P < 0.01$) increase of the interlayer in persons with the virus antibodies in 2014–2016 ($15.8 \pm 0.69\%$) in comparison with 2011–2013 ($9.7 \pm 0.78\%$). Also it was noted in all landscape zones: in steppe zone the increase was to 42.8% ($P > 0.05$); in mountain-taiga-forest-steppe — to 61.3% ($P > 0.05$); in mountain-tundra-taiga — to 150.0% ($P < 0.01$). It was not possible to reveal correlation between the recourse for medical aid and the value of immune interlayer in the population formed as a result of latent immunization. Results of the population immunity studying essentially expand our knowledge about the condition of the natural foci and dynamics of development of the epidemic processes in it, and can be used at planning of the preventive actions.

Key words: tick-borne virus encephalitis, immune interlayer, immune-enzyme analysis, natural focus.

Забайкальский край относится к числу территорий, эндемичных по клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ), а по среднему многолетнему показателю край отнесен к группе со средним ($3,0\text{--}8,4\%$) уровнем заболеваемости [5, 8]. Среди больных КВЭ достаточно высок процент очаговых форм — 35,7% от общего числа заболевших; обращает внимание высокий уровень летальности на фоне невысоких показателей заболеваемости [1]. Эпидемический процесс характеризуется цикличностью, обусловленной различными природными и антропогенными факторами, а также изменяющимися климатическими, социальными и экономическими условиями.

Изучение иммунной прослойки является важным звеном в установлении, подтверждении циркуляции вируса на данной территории, динамики эпизоотолого-эпидемиологической активности природных очагов, дает возможность определить ареал возбудителя инфекции, прогнозировать вероятный уровень заболеваемости. Результаты массового серологического обследования населения, которому в последнее время уделяется недостаточно внимания, позволяют получить представление об интенсивности эпидемического процесса при КВЭ, обусловленного возбудителем этой болезни [6, 10, 11].

Цель — изучение величины иммунной прослойки к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) у населения на различных территориях Забайкальского края, сложившейся в результате естественной иммунизации при посещении природных очагов КВЭ.

Материалы и методы

Контроль состояния иммунной структуры населения к вирусу КЭ является одним из мероприятий по обеспечению надзора за инфекциями, передающимися иксодовыми клещами, регламентированных санитарно-эпидемиологическими правилами [11]. В статье приведены данные Центра гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае о результатах ежегодного осеннего (октябрь) мониторинга естественного иммунитета к вирусу КЭ у здорового населения 31 муниципального района за 2011–2016 гг. Выборки людей формировались пропорционально численности населения в конкретном населенном пункте среди лиц различных возрастных и профессиональных групп, проживающих на территории не менее 10 лет, не привитых против КВЭ. При анализе полученных результатов определяли процент лиц с антителами к вирусу КЭ в каждом муниципальном районе.

Всего исследовано 4367 сывороток крови, в среднем в каждом районе ежегодно по 25 образцов.

Информация по обращаемости по поводу присасывания клещей за 2011–2016 гг. получена из медицинских организаций. Расчет числа пострадавших от присасывания клещей приведен в пересчете на 100 тыс. жителей.

Лабораторное исследование на наличие антител класса G к вирусу КЭ в сыворотках крови населения проводили в ИФА с использованием набора реагентов «ВектоВКЭ-IgG» ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкцией изготовителя. Положительными считали пробы, в которых обнаруживали вирусспецифические антитела в разведении 1:100 и более.

Для статистической обработки данных использованы общепринятые показатели (среднее арифметическое и стандартная ошибка для случаев количественной изменчивости и при альтернативной вариации), а сравнение выборок проведено по критерию Стьюдента с применением пакета программного обеспечения Excel [4].

Результаты

На территории Забайкалья выделяется 3 физико-географических области — Байкало-Джугдурская горно-таежная, Южно-Сибирская

горная и Центрально-Азиатская пустынно-степная [7]. Таежная зона — преобладающий тип ландшафта Забайкальского края. Значительная часть ее территории покрыта лесами. Читинский район расположен в зоне с преобладанием лесостепей в сочетании с сосновыми борами и южной тайгой. Севернее — зоны южной и средней тайги. Далее к востоку в Карымском, Шелопугинском и Балейском районах располагаются территории с преобладанием степей и лесостепей в сочетании с участками южной тайги. Красночикойский район целиком лежит в зоне с преобладанием южной тайги. Оловянинский и Борзинский — степные районы. На юге, в междуречье Борзи и Онона, раскинулась обширная Приононская равнина.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии естественного иммунитета к вирусу КЭ у населения обследованных территорий. Установлено, что среднемноголетний уровень иммунной прослойки (СМУ) в муниципальных районах варьирует от 3,1 до 52,7% (в Забайкальском крае СМУ составил $13,1 \pm 0,51\%$). Территориальное распространение и величина иммунной прослойки показана на рисунке. Величина иммунной прослойки территориально неоднородна.

Высокий СМУ — от 20 до 52,7% характерен для горно-таежно-лесостепной зоны (Красно-

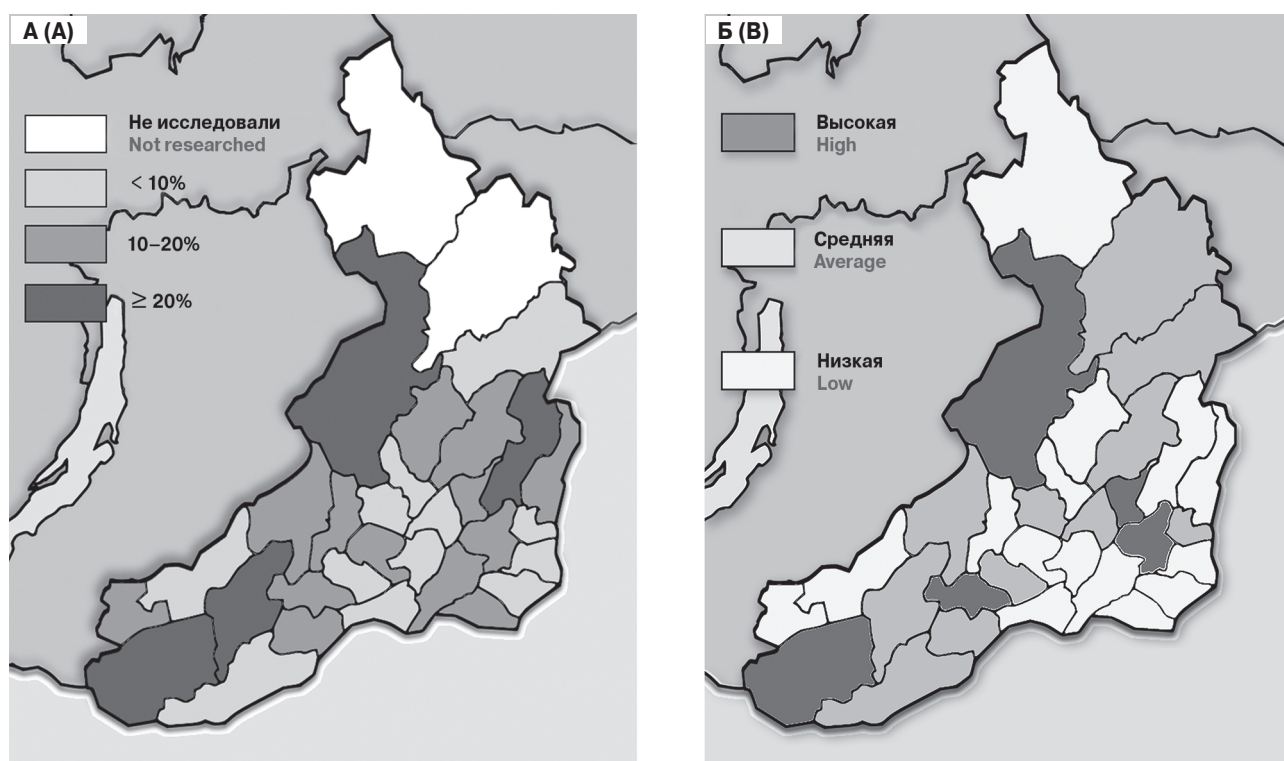


Рисунок. Величина и территориальное распространение иммунной прослойки к вирусу КЭ у здорового взрослого населения в Забайкальском крае в 2011–2016 гг. (А) и распределение муниципальных районов по обращаемости населения с присасыванием клещей (Б)

Figure. The magnitude and the spatial distribution of the immune interlayer to TBE virus among healthy adult humans in the Transbaikalian Territory in 2011–2016 (A) and distribution of the Municipal districts of the humans appealability after tick bites (B)

Таблица. Среднемноголетний уровень иммунной прослойки населения разных ландшафтных зон в 2011–2016 гг.

Table. Average long-term level of immune segment of the population of the different landscape zones in 2011–2016

Исследуемые показатели The studied parameters	Ландшафтные зоны Landscape zones		
	горно-тундрово-таежная mountain tundra and taiga	горно-таежно-лесостепная mountain taiga-forest-steppe	степная steppe
Число исследований The number of studies	275	2923	1169
Число положительных сывороток The number of positive sera	40	417	115
Уровень иммунной прослойки населения, %±m The level of immune segment of the humans	14,5±2,13	14,3±0,65	9,8±0,87
Обращаемость пострадавших от присасывания клещей, ‰±m Uptake affected after tick bites	1124,8±519,12	685,6±112,58	423,8±133,88

чикийский — 23,8±3,36%; Улетовский — 52,4±4,48%; Газимуро-Заводский — 29,4±4,94% (районы), горно-тундрово-таежной зоны (Тунгокоченский район — 20,0±3,58%). В степной зоне уровень иммунной прослойки ниже и наблюдается в районах, где встречаются элементы южно-таежных лиственных и сосновых лесов. Но и здесь имеются территории с довольно высоким уровнем иммунной прослойки (Александр-Заводский — 20,0±4,34%, Борзинский — 11,3±2,50 районы). Величина иммунной прослойки от 10 до 20% отмечена в 13 районах в двух зонах в восточной, южной, западной и центральной частях края. Иммунная прослойка величиной от 3 до 10% установлена еще в 12 районах во всех трех ландшафтных зонах. Каларский и Тунгиро-Олекминский северные районы не обследовали, так как заболеваемость КВЭ на этих территориях не регистрируется. СМУ иммунной прослойки для каждой из ландшафтных зон представлен в таблице.

Установлено, что уровни иммунной прослойки населения, проживающего в горно-таежно-лесостепной и горно-тундрово-таежной зонах достоверно выше, чем в степной — $t = 3,8$; $P < 0,001$ и $t = 2,27$; $P < 0,05$ соответственно. Вместе с тем, различия в величине иммунной прослойки между горно-тундрово-таежной и горно-таежно-лесостепной зонами не достоверны: $t = 0,1$; $P > 0,05$.

Нами проанализирована взаимосвязь двух факторов — обращаемости и величины иммунной прослойки у населения, проживающего на разных территориях края (рис.). Анализ распределения муниципальных районов Забайкальского края на группы с обращаемостью населения по поводу присасывания клещей в период с 2012 по 2016 гг. показал, что наиболее неблагоприятная обстановка по показателю «Число обращений на 100 тысяч населения» сложилась в зоне южной и средней тайги в сочетании с лесостепью, где расположены следу-

ющие районы: Дульдургинский (2109,3±341,1%), Шелопугинский (2058,2±296,7%), Тунгокоченский (1552,6±252,6%), Александр-Заводский (1119,5±166,5%).

К группе муниципальных районов со средней обращаемостью относятся 11 районов, причем они расположены во всех трех ландшафтных зонах. Муниципальные районы, характеризующиеся низкой обращаемостью, расположены преимущественно в степной зоне (15 районов). Сочетание высокого и среднего уровня иммунной прослойки с высокой обращаемостью с присасыванием клещей характерно для жителей, проживающих в следующих районах: Тунгокоченском, Красночикийском, Дульдургинском, Шелопугинском, Улетовском, Читинском, Александр-Заводском. Эти же районы характеризуются высокой и средней интенсивностью заражения КВЭ [5, 9].

Корреляцию между обращаемостью и величиной иммунной прослойки среди населения, образованной в результате латентной иммунизации, выявить не удалось.

Обсуждение

Ранее В.И. Злобиным и О.З. Гориним [3] были обобщены данные обследования и математические расчеты по основным параметрам, в том числе величине иммунной прослойки у населения, что позволило осуществить ландшафтно-эпидемиологическое районирование Забайкалья по КВЭ. По результатам этой работы, для низкой интенсивности заражения величина иммунной прослойки составляла 3–3,4%; средней — 7,0%; повышенной — 10,6–13% (Даурский горно-таежный и подтаежный ландшафтно-эпидемиологический район). Исследованиями В.В. Погодиной, Н.Г. Бочковой и Л.С. Левиной в 1983–1985 гг. в Читинской области установлен уровень иммунной прослойки — до 67,7% [10]. По нашим данным в современный период высо-

кая интенсивность заражения КВЭ сохраняется в Красночикойском, Петровск-Забайкальском, Шелопугинском, Улетовском районах, расположенных в горно-таежно-лесостепной зоне, для которых характерна высокая (более 20%) и средняя (10–20%) величина иммунной прослойки.

Обнаружение специфических антител к вирусу КЭ свидетельствует о естественной иммунизации местного населения, длительно проживающего вблизи природных очагов и неоднократно подвергавшегося укусам клещей, а также возможному инфицированию при употреблении сырого молока коз (коров), на которых питались зараженные переносчики. Как правило, уровень иммунной прослойки оказывался выше на территориях с ежегодно регистрируемой заболеваемостью и значительно ниже там, где показатель повторяемости заболеваний ниже 0,4. Кроме того, наличие иммунной прослойки свидетельствует о продолжающемся эпидемическом процессе, который проявляется в виде клинически выраженных спорадических случаев заболеваний КВЭ. Выявление сероположительных к вирусу КЭ лиц среди населения неэндемичных территорий (Приаргунский, Калганский, Нерчинско-Заводский, Забайкальский, Ононский районы) может быть объяснено наличием инаппарантных форм КВЭ вследствие активности природного очага, возможными контактами населения с иксодовыми клещами при посещении природных очагов КВЭ на других территориях края, нельзя исключить и ложноположительные результаты лабораторной диагностики.

Активная циркуляция вируса КЭ сопровождалась достоверным ($P < 0,01$) увеличением прослойки лиц с антителами к вирусу среди здорового взрослого населения края в 2014–2016 гг. (СМП $15,8 \pm 0,69\%$) по сравнению с 2011–2013 гг. ($9,7 \pm 0,78\%$). Причем, отмечено это во всех ландшафтных зонах: в степной — на 42,8% ($P > 0,05$); в горно-таежно-лесостепной — на 61,3% ($P > 0,05$); в горно-тундрово-таежной на 150,0% ($P < 0,01$).

Между тем, при сравнении данных 2011–2013 гг. и 2014–2016 гг. по показателю обращаемости людей, пострадавших от присасывания клещей, в Забайкальском крае выявлено его достоверное снижение: с $443,8 \pm 19,64$ до $341,1 \pm 17,45\text{‰}$ соответственно; $P < 0,05$). По трем ландшафтными зонам изменение величины СМП обращаемости с присасыванием клещей было разнонаправленным, но во всех случаях не значимым ($P > 0,05$).

Одним из основных факторов, влияющих на уровень заболеваемости КВЭ, является обращаемость населения в лечебные учреждения по поводу присасывания клещей, случающегося при посещении природных и антропогенных очагов [2, 7]. Интенсивность заражения обусловлена частотой контактов с инфицированными переносчиками и влияет на величину иммунной прослойки, однако нам не удалось установить прямую связь между частотой контактов населения с клещами и уровнем иммунной прослойки.

Заключение

Таким образом, изучение иммунной прослойки (естественного иммунитета) у здорового населения Забайкальского края показало, что практически на всей обследованной территории жители в той или иной степени контактируют с вирусом КЭ. Выраженные различия величины иммунной прослойки обусловлены ландшафтным разнообразием, при этом в каждой ландшафтной зоне интенсивность эпидемического процесса относительно стабильна. Более активно циркуляция вируса происходит в таежно-лесостепной зоне. Результаты изучения популяционного иммунитета населения существенно дополняют наши представления о состоянии природных очагов КВЭ и динамики развития эпидемических процессов, происходящих в них, и могут быть использованы при планировании профилактических мероприятий.

Список литературы/References

1. Андаев Е.И., Трухина А.Г., Карань Л.С., Погодина В.В., Гамова Е.Г., Бочкова Н.Г., Борисова Т.И., Нагибина О.А., Вершинин Е.А., Сидорова Е.А. Клещевой энцефалит в Читинской области и этиология очаговых форм с летальным исходом // Бюллетень СО РАМН. 2007. Т. 126, № 4. С. 60–65. [Andaev E.I., Trukhina A.G., Karan L.S., Pogodina V.V., Gamova E.G., Bochkova N.G., Borisova T.I., Nagibina O.A., Vershinin E.A., Sidorova E.A. Tick-borne encephalitis in the Chita region and the etiology of focal forms with a fatal outcome. *Byulleten' Sibirskogo Otdeleniya Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2007, vol. 126, no. 4, pp. 60–65. (In Russ.)]
2. Веригина Е.В., Симонова Е.Г., Черныявская О.П., Пакскина Н.Д. Современная эпидемиологическая ситуация и некоторые результаты мониторинга за клещевым энцефалитом в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2013. № 4 (71). С. 14–20. [Verigina E.V., Simonova E.G., Chernyavskaya O.P., Pakskina N.D. Contemporary epidemiological situation and some of the monitoring results for tick-borne encephalitis virus. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2013, no. 4 (71), pp. 14–20. (In Russ.)]
3. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит: этиология, эпидемиология и профилактика в Сибири. Н.: Наука, 1996. С. 65–80. [Zlobin V.I., Gorin O.Z. *Kleshchevyy entsefalit: etiologiya, epidemiologiya i profilaktika v Sibiri* [Tick-borne encephalitis: etiology, epidemiology and prevention in Siberia]. Novosibirsk: Nauka, 1996, pp. 65–80.]
4. Ивантер Э.В., Коросов А.В. Элементарная биометрия. П.: ПетргУ, 2013. 110 с. [Ivanter E.V., Korosov A.V. *Elementarnaya biometriya* [Elementary biometrics]. Petrozavodsk: Petrozavodskii Gosudarstvennyi Universitet, 2013. 110 p.]

5. Ильин В.П., Андаев Е.И., Балахонов С.В., Носков А.К., Туранов А.О. Алгоритм классификации муниципальных образований субъекта Российской Федерации, основанный на оценке доверительного интервала заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом (на примере Забайкальского края) // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. 2013. № 6 (94). С. 115–121. [Il'in V.P., Andaev E.I., Balakhonov S.V., Noskov A.K., Turanov A.O. Algorithm classification of municipal unions of the Russian Federation region based on a confidential interval estimation of tick-borne encephalitis virus incidence (Transbaikalian Krai as an example). *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi Akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, no. 6 (94), pp. 115–121. (In Russ.)]
6. Лучинина С.В., Семенов А.И., Степанова О.Н., Погодина В.В., Герасимов С.Г., Щербинина М.С., Колесникова Л.И., Сулова Т.А. Вакцинопрофилактика клещевого энцефалита в Челябинской области: масштабы вакцинации, популяционный иммунитет, анализ случаев заболевания привитых // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. № 1 (86). С. 67–76. [Luchinina S.V., Semenov A.I., Stepanova O.N., Pogodina V.V., Gerasimov S.G., Shcherbinina M.S., Kolesnikova L.I., Suslova T.A. Vaccinal prevention of Tick-borne encephalitis in Chelyabinsk region: dynamics of vaccination, population immunity, analysis of TBE cases in vaccinated persons. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2016, no. 1 (86), pp. 67–76. (In Russ.)]
7. Львов Д.К., Злобин В.И. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе // Вопросы вирусологии. 2007. Т. 52, № 5. С. 26–30. [Lvov D.K., Zlobin V.I. Prevention of tick-borne encephalitis at the present stage: strategy and tactics. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2007, vol. 52, no. 5, pp. 26–30. (In Russ.)]
8. Малая энциклопедия Забайкалья: Природное наследие. Гл. ред. Р.Ф. Гениатулин. Н.: Наука, 2009. 698 с. [Malaya entsiklopediya Zabaikal'ya: Prirodnoe nasledie. Gl. red. R.F. Geniatulin. N.: Nauka, 2009. 698 p.]
9. Носков А.К., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В., Иннокентьева Т.И., Балахонов С.В. Клещевой 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. № 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, iss. 1, pp. 37–43. doi: 10.21055/0370-1069-2017-1-37-43 (In Russ.)]
10. Погодина В.В., Щербинина М.С., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Колясникова Н.М. Современные проблемы специфической профилактики клещевого энцефалита. Сообщение II: Особенности иммунитета в зоне доминирования сибирского подтипа возбудителя // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. № 6 (85). С. 65–73. [Pogodina V.V., Shcherbinina M.S., Levina L.S., Gerasimov S.G., Kolyasnikova N.M. Modern problems of tick-borne encephalitis specific prevention. Communication II: peculiarity of immunity in area with siberian subtype domination. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, no. 6 (85), pp. 65–73. (In Russ.)]
11. Профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3310-15. Утверждены и введены в действие с 26.02.2016 г. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 17 ноября 2015 г. № 78. Москва, 2016. URL: <http://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293756/4293756502.htm> (25.05.2018)

Авторы:

Туранов А.О., главный врач ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае, г. Чита, Россия;
Никитин А.Я., д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия;
Андаев Е.И., д.м.н., заместитель директора по общим вопросам и организационно-методической работе, заведующий лабораторией природно-очаговых вирусных инфекций ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск, Россия.

Authors:

Turanov A.O., Chief Doctor of Center of Hygiene and Epidemiology in Transbaikalian Territory, Chita, Russian Federation;
Nikitin A.Ya., PhD, MD (Biology), Docent, Leading Researcher, Zoological and Parasitological Department, Irkutsk Antiplague Research, Irkutsk, Russian Federation;
Andaev E.I., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for General Issues and Organizational and Methodological Activities, Head of the Laboratory of Natural Focal Viral Infections, Irkutsk Antiplague Research, Irkutsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.12.2017
 Принята к печати 14.05.2018

Received 08.12.2017
 Accepted 14.05.2018

ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ПОПУЛЯЦИОННОГО ИММУНИТЕТА НА СТРУКТУРУ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ И КРАСНУХОЙ

А.П. Топтыгина^{1,3}, М.А. Смердова¹, М.А. Наумова¹, Н.П. Владимирова²,
Т.А. Мамаева¹

¹ ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москва Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме. На основании многолетних серологических обследований лиц, переболевших корью и краснухой, сложилось представление о том, что основным фактором сохранения невосприимчивости к этим инфекциям являются специфические антитела, циркулирующие в крови переболевшего практически в течение всей его жизни. Это мнение распространилось и на привитых вакцинами, в связи с этим в России проводится серологический мониторинг за привитыми коревой и краснушной вакцинами лиц разного возраста. Однако в последние годы возникла ситуация несоответствия результатов изучения напряженности специфического иммунитета с показателями заболеваемости корью. Используя тест-системы фирмы «Вектор-Бест», было проведено изучение противокорьевого и противокраснушного иммунитета населения возрастных групп до 1 года, 1–2 года, 3–6 лет, 7–14 лет, 15–17 лет, 18–30 лет, 31–40 лет, 41–50 лет и 51–60 лет на территории Москвы и Московской области за 2013 г. (территория с неблагоприятной эпидемической ситуацией). Были исследованы сыворотки крови от 654 случайно выбранных условно здоровых лиц и 646 пациентов того же региона с серологически подтвержденной коревой инфекцией. В результате было выявлено постепенное нарастание процента лиц, имеющих защитные уровни антител к вирусам краснухи и кори, достигающее в возрасте 7–14 лет 81,3% для кори и более 90% для краснухи. При этом процент защищенных против краснухи сохранялся и в более старшем возрасте, тогда как в возрастной группе 18–30 лет обнаружено наиболее выраженное увеличение уровня серонегативных к вирусу кори (40% и более), а в группах старше 40 лет защищенность достигала уровня 85–95%. При сопоставлении доли заболевших корью лиц разного возраста с процентом лиц, имеющих защитный уровень антител в сыворотке крови, выявлена сильная отрицательная корреляция между заболеваемостью корью и уровнем напряженности популяционного противокорьевого иммунитета ($r = -0,76$). Так, увеличение (до 28%) и снижение (до 2,9%) числа заболевших в возрастных группах 18–30 и 51–60 лет обеспечивалось снижением (до 55%) и увеличением (до 95%) лиц с защитными показателями иммунитета соответственно. Результаты анализа заболеваемости корью в разных возрастных группах показали, что среди взрослых больных (18–50 лет) ответили на инфекцию вторичным типом иммунного ответа 14,5%; среди детей и подростков таких больных выявлено не было, что свидетельствует о высокой эффективности вакцинопрофилактики.

Ключевые слова: корь, краснуха, антитела, популяционный иммунитет, заболеваемость, серомониторинг.

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: (495) 452-18-01 (служебн.). Факс: (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Contacts:

Anna P. Toptygina
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology
and Microbiology.
Phone: (495) 452-18-01 (office). Fax: (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru.

Библиографическое описание:

Топтыгина А.П., Смердова М.А., Наумова М.А., Владимирова Н.П., Мамаева Т.А. Влияние особенностей популяционного иммунитета на структуру заболеваемости корью и краснухой // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 341–348. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348

Citation:

Toptygina A.P., Smerdova M.A., Naumova M.A., Vladimirova N.P., Mamaeva T.A. Influence of population immunity peculiarities on the structure of measles and rubella prevalence // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 341–348. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-341-348

INFLUENCE OF POPULATION IMMUNITY PECULIARITIES ON THE STRUCTURE OF MEASLES AND RUBELLA PREVALENCE

Toptygina A.P.^{a,c}, Smerdova M.A.^a, Naumova M.A.^a, Vladimirova N.P.^b, Mamaeva T.A.^a

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Centre for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russian Federation

^c Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. According to the lasting serological investigations of patients with rubella and measles, a major factor that determines the resistance to the infections is specific antibodies, that are still circulating in blood of recovered persons during their life. Since vaccinated people are also included in this concept, serological monitoring of people different ages who get vaccinated against rubella and measles is conducted in Russia. However the discrepancy between specific immunity intensity and the measles incidence was showed last years. Using “Vector Best” kits, the study of the anti-measles and anti-rubella population immunity in scale of age: under 1 year, 1–2 years, 3–6 years, 7–14 years, 15–17 years, 18–30 years, 31–40 years, 41–50 years, and 51–60 years was carried out in Moscow and Moscow region in 2013 (period of unfavorable epidemic situation). The serum probes were obtained from 654 random healthy donors and 646 patients with serologically confirmed measles infection. As a result, gradual increase of percentage of people with protective antibodies to rubella and measles have been demonstrated: 81.3% donors aged 7–14 years were protected from measles and more than 90% — from rubella. Moreover, percentage of individuals who have had immunity to rubella were the same in adults too. The most marked increase of percentage of seronegative persons to measles virus (40% and more) was in age from 18 to 30 years, and in groups over the age 40 years old protection reaches 85–95%. Comparison between percentage of measles patients different ages and percentage of persons with protective antibodies in serum have demonstrated significant negative correlation between measles prevalence and the level of specific antibody in population ($r = -0.76$). According to the results, increase (to 28%) and decrease (to 2.9%) of measles patients aged 18 to 30 and 51 to 60 years are based on decrease (to 55%) and increase (to 95%) of persons with protective immunity, respectively. Results of analysis of measles prevalence in different ages have demonstrated, that among adult measles patients (18–50 years) 14.5% responded on infection by secondary immune response; among children and teenagers there were no such patients, that proves the significant effectiveness of prophylactic vaccines.

Key words: measles, rubella, antibodies, population immunity, prevalence, seromonitoring.

Введение

Корь — острое, тяжелое, высококонтагиозное (96%) вирусное заболевание, которое долгое время считалось исключительно детской инфекцией. Однако в результате многолетней практики прививок детей (прививка от кори, согласно приказу МЗ РФ, проводится детям в 1 год и 6 лет) спектр заболеваемости изменился. На данный момент отмечается 2 пика заболеваемости: дети, еще не привитые от этой инфекции и молодежь 18–30 лет, среди которых есть как привитые в детстве, так и непривитые [7]. Даже в странах с высоким охватом вакцинацией против кори периодически случаются довольно крупные вспышки [15]. Так в Румынии вспышка кори 2016–2017 гг. охватила более 7000 человек, преимущественно маленьких детей и в 31 случае заболевание закончилось смертью [9]. В том же 2017 г. вспышка кори в Италии охватила около 4500 человек и 70% заболевших составили люди в возрасте 15–30 лет [10]. Причиной заболеваемости среди взрослых могли стать первичные вакцинальные неудачи, когда 5–10% привитых остаются серонегативными, или вторичные вакцинальные неудачи, когда ответивший на вакцинацию человек слишком быстро теряет защитный уровень антител [12]. Снижение напряженности коллективного иммунитета про-

тив кори у привитых может быть также связано со снижением циркуляции диких штаммов вируса кори на этапе элиминации и отсутствием естественного бустер-эффекта у привитых [11]. Учитывая вышесказанное, мы имеем с одной стороны, высокоиммунизированную популяцию населения, а с другой — возникающие с определенной периодичностью вспышки кори, захватывающие лиц разного возраста. В связи с этим, целью данного исследования явилось изучение популяционного иммунитета населения на территории с неблагоприятной эпидемической ситуацией. Для этого необходимо было определить напряженность противокорревого иммунитета у лиц разного возраста и сопоставить полученные данные с заболеваемостью корью на одной территории.

Материалы и методы

Материалом исследования напряженности противокорревого иммунитета были сыворотки крови 654 случайно выбранных условно здоровых лиц Москвы и Московской области с неизвестным прививочным анамнезом в возрасте от 0 до 60 лет. Исследования проводились на базе референс-лаборатории ЕРБ ВОЗ, ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Материалом анализа возрастной структуры больных корью

стали 646 пациентов Москвы и Московской области, серологическое подтверждение коревой инфекции у которых осуществлялось методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно алгоритму дифференциальной диагностики [1] и рекомендациям ВОЗ [14] на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москва». Биоматериал от здоровых и больных людей собирали в течение 2013 г. (неблагоприятная эпидемиологическая ситуация на обследованной территории). Обследованные лица были разделены на следующие возрастные группы: до 1 года, 1–2 года, 3–6 лет, 7–14 лет, 15–17 лет, 18–30 лет, 31–40 лет, 41–50 лет и 51–60 лет. Количественный состав групп представлен в таблицах 1 и 2.

Взятие крови осуществляли из локтевой вены в количестве 4 мл. Сыворотку крови, полученную для определения коревого иммунитета, разливали в пробирки типа «Эппендорф», замораживали и хранили до использования при -70°C . Сыворотку крови больных корью получали на 4–6 день после появления сыпи и тестировали в течение 72 ч. Специфические антитела М и G классов и авидность коревых IgG в сыворотке крови определяли методом ИФА с помощью тест-систем фирмы «Вектор-Бест» (Россия) «ВектоКорь IgM», «ВектоКорь IgG», «ВектоКраснуха IgG» и «Avidity:Anti-Measles Viruses ELISA/IgG» фирмы «Euroimmun» (Германия).

Оценку специфической активности сывороток осуществляли согласно регламентируемой нормативно-технической документации на используемые наборы: при определении IgM — по величине оптической плотности (ОП) в оптических единицах (о.е.), IgG — по концентрации антител в МЕ/мл, авидность IgG по проценту диссоциации специфических антител. Защитным уровнем IgG для кори считали показатель 0,2 МЕ/мл [13] и 25 МЕ/мл для краснухи. Разделение обследуемых лиц на группы с поствакцинальным и постинфекционным иммунитетом осуществляли по величине содержания IgG (МЕ/мл) [3]. При этом позитив-

ное значение концентрации специфических IgG менее 1,0 МЕ/мл считалось показателем поствакцинальной реакции, тогда как более высокие показатели свидетельствовали о перенесенной инфекции. Для краснухи таким пороговым значением считалось 200 МЕ/мл.

Разделение лабораторно подтвержденных случаев кори на случаи с первичным и вторичным типом иммунного ответа, осуществляли по концентрации и авидности IgG. Наличие в сыворотке крови, полученной на 4–6 день после появления сыпи, низкоавидных (< 40%) IgG в низкой концентрации (< 2,0 МЕ/мл) свидетельствовало о первичном иммунном ответе; выявление высокоавидных (> 80%) IgG в высокой концентрации (> 5,0 МЕ/мл) характеризовало вторичный иммунный ответ.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с вычислением медианы, первого и третьего квартилей.

Результаты

Оценка среднего уровня специфических противовирусных антител по группам показала, что всего у 4 детей до 1 года были обнаружены антитела защитного уровня к вирусу кори. Антитела к вирусу краснухи в низком, но защитном количестве обнаружены у 6 детей в возрасте до 6 месяцев и у 6 детей от 6 мес. до 1 года. Эти антитела были расценены как материнские. В то же время был выявлен 1 ребенок в возрасте 6 мес. с очень высоким уровнем (4,415 МЕ/мл) противокоревых антител, что говорит о недавно перенесенной инфекции, и 2 ребенка в возрасте до 1 года с высоким уровнем краснушных антител, что также свидетельствует о недавно перенесенной инфекции. В более старших возрастных группах (см. табл. 1) средний уровень антител превышает защитный уровень. Интересно, что в возрастной группе от 18 до 30 лет отмечается наиболее высокий уровень антител к вирусу краснухи и минимальный уровень антител к кори.

Таблица 1. Уровень противовирусных антител в сыворотке крови обследованных доноров в зависимости от возраста, Me (LQ–UQ)

Table 1. The level of the antiviral antibodies in the serum of donors in dependent on age, Me (LQ–UQ)

	До 1 года < 1 year n = 88	1–2 года 1–2 year n = 34	3–6 лет 3–6 years n = 94	7–14 лет 7–14 years n = 121	15–17 лет 15–17 years n = 48	18–30 лет 18–30 years n = 87	31–40 лет 31–40 years n = 64	41–50 лет 41–50 years n = 64	51–60 лет 51–60 years n = 62
Краснуха, МЕ/мл Rubella, ME/ml	5,377 (1,218– 10,392)	132,686 (2,951– 501,364)	267,661 (111,866– 493,934)	198,923 (89,908– 439,729)	322,826 (148,969– 462,888)	400,342 (200– 628,795)	345,135 (92,515– 592,922)	274,462 (161,681– 547,107)	250,056 (129,177– 539,368)
Корь, МЕ/мл Measles, ME/ml	0,011 (0– 0,041)	0,478 (0,065– 1,131)	0,412 (0,154– 0,847)	0,398 (0,185– 0,732)	0,287 (0,121– 0,597)	0,237 (0,104– 0,549)	0,355 (0,134– 0,973)	0,807 (0,403– 2,407)	2,182 (1,562– 3,401)

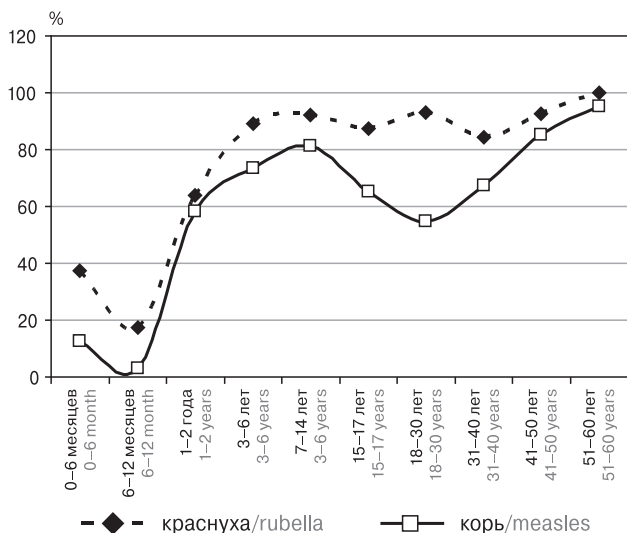


Рисунок 1. Возрастная динамика процента лиц с защитным уровнем специфических антител к вирусам кори и краснухи

Figure 1. Age dependent percentage of the persons with the protective level of anti-measles and anti-rubella antibodies

Примечание. По оси абсцисс — возраст в годах.
Note. Abscissa — number of years.

Анализ процента лиц, имеющих защитный уровень специфических антител в зависимости от возраста (рис. 1) показал, что у младенцев до 6 мес. защитные уровни антител против краснухи обнаруживаются в 37,5% случаев, а против кори — в 12,5% случаев. К 1 году эти показатели снижаются до 17,2 и 3,1% соответственно. В воз-

расте 1–2 лет (1 доза вакцины) антитела достигают защитного уровня у 64% детей для краснухи и 58,2% для кори. В возрасте 6 лет (вторая доза вакцины) эти показатели повышаются до 89 и 73,4% соответственно. Далее уровень защищенности от краснухи превышает 90% вплоть до старшей возрастной группы. Уровень антител против кори достигает максимума в 81,3% возрасте 7–14 лет и начинает снижаться до уровня 54,7% в возрасте 18–30 лет. В старшем возрасте начинается подъем, и в группах старше 40 лет защищенность достигает уровня 85–95%.

Казалось бы более благоприятная ситуация с краснухой, когда после 6 лет достигается плато на уровне 90% защищенных и выше, на самом деле обеспечивается в большей степени за счет переболевших этой инфекцией (40–50% в детском возрасте и 70–80% у взрослых) (рис. 2А). Процент переболевших корью (на основании лабораторных данных) довольно долго держится на уровне 15–20% и начинает увеличиваться после 30 лет (рис. 2Б).

Результаты анализа заболеваемости в разных возрастных группах больных корью показали, что ведущая роль принадлежит взрослым: 65% из общего числа заболевших (табл. 2). Доля заболеваемости подростков в общей заболеваемости была мала и составила 1,7%.

Из числа взрослых больных 80,2% составили лица в возрасте 18–40 лет, из них вторичным иммунным ответом реагировал на инфекцию 61 человек (18,1%). Следует отметить, что больные с вторичным иммунным ответом были выявлены только среди взрослых (рис. 3): 12,2%

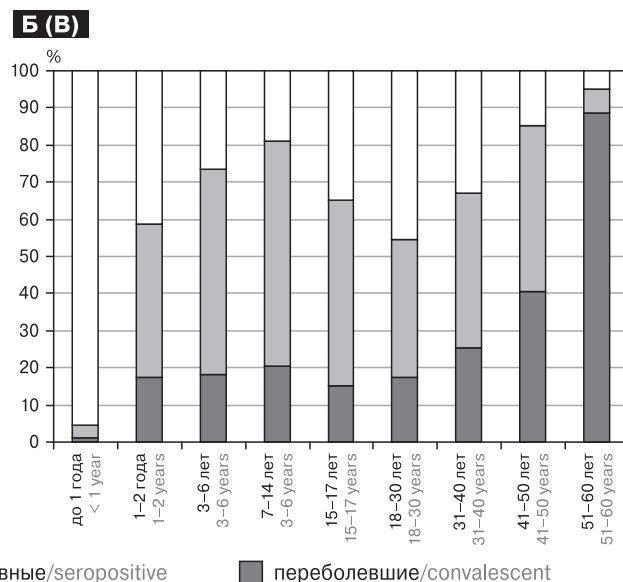
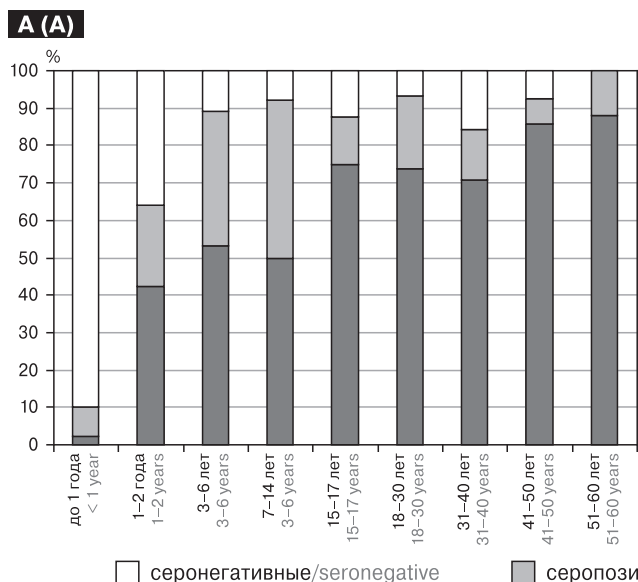


Рисунок 2. Структура иммунитета (%) против вирусов кори и краснухи у здоровых людей в зависимости от возраста

Figure 2. Age dependent structure (%) of anti-measles and anti-rubella immunity in healthy people

Примечание. А — краснуха. Б — корь. По оси абсцисс — возраст в годах.
Note. А — rubella. В — measles. Abscissa — number of years.

Таблица 2. Структура заболевших корью в зависимости от возраста

Table 2. Structure of the measles patients in dependent of age

Возрастные группы Age	Абс. Abs.	%	Возрастные группы Age	Абс. Abs.	%
До 1 года /> 1 year	38	5,9	18–30 лет /18–30 year	181	28,0
1–2 года /1–2 year	70	10,8	31–40 лет /31–40 year	156	24,1
3–6 лет /3–6 year	52	8,1	41–50 лет /41–50 year	66	10,22
7–14 лет /7–14 year	55	8,5	51–60 лет /51–60 year	17	2,63
15–17 лет /15–17 year	11	1,7			
Всего детей и подростков Total children and teenagers	226	35,0	Всего взрослых Total adults	420	65,0

в возрастной группе 18–30 лет, 18,6% — в группе 31–40 лет, а в группе 41–50 лет больные с вторичным иммунным ответом составили 15,2%. Лиц с вторичным иммунным ответом среди детей, подростков и взрослых старше 50 лет выявлено не было.

На рисунке 4 представлены результаты сопоставления процента больных разного возраста с долей лиц того же возраста, имеющих защитный уровень специфических антител в сыворотке крови. Показано, что любые изменения в состоянии напряженности противокорьевого иммунитета в возрастных группах отражаются на заболеваемости той же возрастной группы. Наиболее наглядным примером являются результаты, полученные при сравнении возрастных групп 18–30 и 31–40 лет.

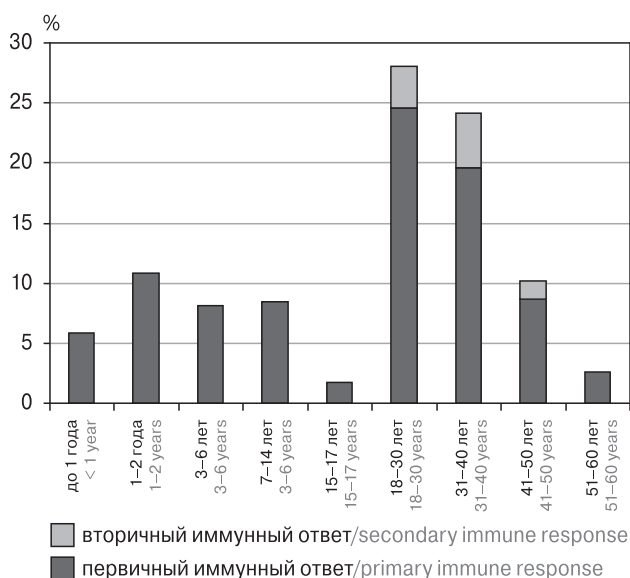
**Рисунок 3. Возрастная структура иммунного ответа больных корью с первичным и вторичным иммунным ответом**

Figure 3. Age dependent structure of immune responses in measles patients with primary and secondary immune responses.

Примечание. По оси абсцисс — возраст в годах.

Note. Abscissa — age groups.

Обсуждение

На основании многолетних серологических обследований лиц, переболевших корью и краснухой, сложилось представление о том, что основным фактором сохранения невосприимчивости к этим инфекциям являются специфические антитела, циркулирующие в крови переболевшего практически в течение всей его жизни. Мнение о ведущей роли специфических антител в предохранении от заболевания распространилось и на привитых вакцинами. В связи с этим, заинтересованными в эпидемиологическом благополучии организациями в разных странах проводятся мероприятия по изучению напряженности противокорьевого иммунитета. Одни страны проводят территориальные ис-

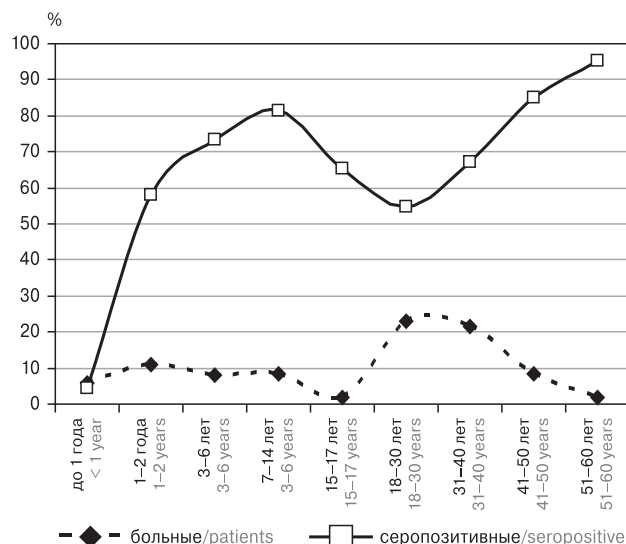
**Рисунок 4. Сопоставление заболеваемости корью (%) с процентом здоровых людей, имеющих защитный уровень противокоревых антител в зависимости от возраста**

Figure 4. Age dependent comparison of measles prevalence (%) with percentage of persons with protective level of anti-measles antibodies

Примечание. По оси абсцисс — возраст в годах.

Note. Abscissa — age groups.

следования ежегодно во всех возрастных группах, другие — каждые 5 лет, меняя возрастную структуру обследуемых [4]. Основным методом в проведении таких обследований является метод ИФА, позволяющий проводить крупномасштабные мероприятия.

В нашей стране согласно основополагающим документам по проведению серомониторинга [2, 5] предусмотрено обследование привитых лиц разного возраста на всех территориях России. Однако международная миграционная ситуация, отсутствие документированных прививок, отказ от вакцинации не позволяют полноценно оценить иммунную прослойку населения, используя только обследование привитых.

В настоящей работе предпринята попытка оценить напряженность иммунитета против кори и краснухи в популяции на одной территории (Москва и Московская область) и сопоставить эти данные с эпидемической ситуацией этого региона.

Анализ структуры защищенности от коревой инфекции выявил интересные закономерности: достаточно выраженное снижение серопозитивных в возрасте 18–30 лет не сопровождается резким увеличением прироста переболевших (рис. 2Б). Действительно, уровень серонегативных в этом возрастном диапазоне составляет около 40%, а прирост процента переболевших начинается после 30 лет и составляет 10–12%. Такая картина может быть объяснена, если учесть, что противокоревой иммунитет осуществляется не только специфическими антителами, но и за счет клеточного иммунитета — специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. Известно, что специфические цитотоксические Т-лимфоциты формируются как в ответ на инфекцию, так и на вакцинацию против кори и долгие годы сохраняются в организме иммунного человека [8]. Специфические антитела и цитотоксические Т-лимфоциты сохраняются в организме независимо и вполне возможно, что часть привитых в детстве серонегативных взрослых еще сохраняют клеточный компонент защиты и поэтому не заболевают корью. В более старшем возрасте отмечается быстрый прирост процента переболевших, достигающий в группе старше 50 лет 90%.

Высокий процент переболевших краснухой среди серопозитивных детей и подростков может быть связан с недостатками в регистрации заболеваемости этой инфекцией, когда стертые формы протекают под маской других диагнозов. Так за исследованный период на территории Москвы и Московской области зарегистрировано всего 27 случаев краснухи и только среди взрослых. Понятно, что вакцина против краснухи введена в нашей стране относительно недавно, тем не менее, у детей

в возрасте 1–2 года и 3–6 лет, которые должны были по возрасту быть привитыми, более половины серопозитивных составляют переболевшие краснухой.

При сопоставлении доли заболевших корью с процентом лиц, имеющих защитный уровень антител в сыворотке крови, выявлена сильная отрицательная корреляция между заболеваемостью корью и уровнем напряженности популяционного противокорьевого иммунитета ($r = -0,76$). Так, увеличение (до 28%) и снижение (до 2,9%) числа заболевших в возрастных группах 18–30 и 51–60 лет обеспечивалось снижением (до 55%) и увеличением (до 95%) лиц с защитными показателями иммунитета соответственно.

Результаты анализа заболеваемости корью в разных возрастных группах больных корью показали, что среди детей и подростков не было выявлено лиц, отвечающих на коревую инфекцию вторичным иммунным ответом. Это свидетельствует о высокой эффективности вакцины и необходимости строгого выполнения правил программы вакцинопрофилактики. Среди взрослых больных четко различаются 2 подгруппы: отвечающие на инфекцию первичным иммунным ответом (80–90%) и реагирующие на корь вторичным иммунным ответом (10–20%). Понятно, что первичным иммунным ответом реагируют не привитые ранее люди, хотя в эту же группу могут попасть и лица с первичными вакцинальными неудачами, а также те, кому вакцинация была сделана с нарушением правил. Причинами заболеваемости взрослых привитых, как было сказано выше, могут быть как вторичные вакцинальные неудачи, так и отсутствие бустирования диким вирусом привитых из-за снижения интенсивности циркуляции вируса на этапе элиминации кори [6]. Эта группа оказалась достаточно большой; в нее, в зависимости от возраста, рискует попасть каждый пятый (десятый) добросовестно привитый взрослый.

Учитывая выявленные закономерности: значимое снижение напряженности коллективного иммунитета и повышение процента лиц, реагирующих на корь вторичным иммунным ответом, представляется целесообразным обсудить вопрос о введении третьей дозы коревой вакцины для серонегативных в возрасте 17–18 лет (11 класс школы) с целью активации противокорьевого иммунитета у привитых и создания иммунной защиты у все еще не привитых к этому возрасту. В то же время прививка в возрастной группе старше 50 лет не выглядит целесообразной, так как в этой возрастной категории практически все люди имеют защитные уровни антител против кори и краснухи, полученные тем или иным путем.

Второй важный итог проведенной работы касается подбора групп для серомониторинга. Принятый на сегодняшний момент модус проверять напряженность противoinфекционного иммунитета на популяции привитых, имеющих соответствующие подтверждающие документы, по-видимому, не вполне соответствует реальной защищенности населения от той или иной инфекции. При таком подходе из рассмотрения исключаются непривитые, лица утерявшие документы о детских прививках, переболевшие какими-то сыпными заболеваниями. Более того, не исключены искажения истинной картины из-за прививок некачественной вакциной (нарушения условий ее транспортировки и хранения) или за счет намеренного или случайного предоставления некорректных данных о проведенных привив-

ках. А ведь именно в этих группах и находятся наиболее уязвимые для инфекций лица. В связи с этим, представляется правильным проводить серомониторинг напряженности противoinфекционного иммунитета на случайной выборке обследуемых лиц. При этом необходимо сопоставлять данные прививочных карт обследованных с результатами лабораторного тестирования, позволяющего достаточно точно определить, был ли данный человек привит или переболел, утерять ли данный конкретный человек свой поствакцинальный иммунитет или лишь числится в привитых, а на самом деле таковым не является. Такой подход дает намного больший материал для анализа и понимания процессов поддержания напряженности коллективного противoinфекционного иммунитета.

Список литературы/References

1. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А., Говорухина М.В., Калашникова Н.А., Бичурина М.А., Мукомолов С.Л. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации // *Инфекция и иммунитет*. 2015. Т. 5, № 1. С. 55–62. [Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Naumova M.A., Govoruhina M.V., Kalashnikova N.A., Bichurina M.A., Mukomolov S.L. Algorithm of laboratory confirmation and differential diagnosis of measles infection at the stage of the measles elimination program in Russia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 55–62. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-55-62 (In Russ.)]
2. МУ 3.1.2943-11 «Организация и проведение серологического мониторинга и состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)» [МУ 3.1.2943-11 “Organization and implementation of the serological monitoring and the collective immunity state to the infection controlled by specific immunoprophylaxis (diphtheria, tetanus, hooping-cough, measles, rubella, mumps, poliomyelitis, hepatitis B”)]
3. Попова А.Ю., Бичурина М.А., Лаврентьева И.Н., Железнова Н.В., Антипова А.Ю., Щербакова С.А., Буаро М.Й., Тотолия А.А. Изучение уровня иммунитета к вирусу кори в отдельных группах населения Гвинейской Республики в рамках глобальной программы элиминации кори. Сообщение 1 // *Инфекция и иммунитет*. 2016. Т. 6, № 4. С. 353–358. [Popova A.Yu., Bichurina M.A., Lavrentyeva I.N., Zheleznova N.V., Antipova A.Yu., 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 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 353–358. doi: 10.15789/2220-7619-2016-4-353-358 (In Russ.)]
4. Самойлович Е.О. Надзор за корью в Республике Беларусь: подготовка к верификации элиминации инфекции // *Медицинский журнал*. 2014. № 2. С. 94–99. [Samoilovich E.O. Measles surveillance in Belarus: background for verification of infection elimination. *Meditsinskii zhurnal = Medical Journal*, 2014, no. 2, pp. 94–99. (In Russ.)]
5. СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита» [SP 3.1.2952-11 “Prevention of measles, rubella and mumps”]
6. Топтыгина А.П. Общие закономерности формирования и поддержания специфического гуморального иммунного ответа на примере ответа на вирусы кори и краснухи // *Инфекция и иммунитет*. 2014. Т. 4, № 1. С. 7–14. [Toptygina A.P. Common mechanisms of specific humoral immune response’ shaping and sustaining by the example of immune response to measles and rubella viruses. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, vol. 4, no. 1, pp. 7–14. doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-7-14 (In Russ.)]
7. Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алешкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори // *Инфекция и иммунитет*. 2013. Т. 3, № 3. С. 243–250. [Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Alioshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 3, pp. 243–250. doi: 10.15789/2220-7619-2013-3-243-250 (In Russ.)]
8. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» // *Иммунология*. 2013. Т. 34, № 5. С. 257–261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, vol. 34, no. 5, pp. 257–261 (In Russ.)]
9. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: Measles — monitoring European outbreaks, 7 July 2017. Stockholm: ECDC. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-measles-monitoring-european-outbreaks-7-july-2017> (Accessed 31 Aug 2017)
10. Filia A., Bella A., Del Manso M., Baggieri M., Magurano F., Rota M.C. Ongoing outbreak with well over 4,000 measles cases in Italy from January to end August 2017 — what is making elimination so difficult? *Euro Surveill.*, 2017, vol. 22 (37), p. 30614. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.37.30614

11. Hickman C.J., Hyde T.B., Sowers S.B., Mercader S., McGrew M., Williams N.J., Beeler J.A., Audet S., Kiehl B., Nandy R., Tamin A., Bellini W.J. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J. Infect. Dis.* 2011, vol. 204, suppl. 1, pp. 549–558. doi: 10.1093/infdis/jir106
12. Orenstein W.A., Strebel P.M., Papania M., Sutter R.W., Bellini W.J., Cochi S.L. Measles eradication: is it in our future? *Am. L. Public Health.*, 2000, vol. 90, pp. 1521–1525.
13. Tischer A., Gassner M., Richard J.-L., Suter-Riniker F., Mankertz A., Heininger U. Vaccinated students with negative enzyme immunoassay results show positive measles virus-specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralization test. *J. Clin. Virol.*, 2007, vol. 38, pp. 204–209. doi: 10.1016/j.jcv.2006.12.017
14. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection; 2 ed. Geneva, Switzerland: WHO, 2006, pp. 58–65.
15. World Health Organization Regional Office for Europe (WHO/Europe). Fifth Meeting of the European Regional Verification Commission for Measles and Rubella Elimination (RVC) 24–26 October 2016, Copenhagen, Denmark. Copenhagen: WHO/Europe. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/330917/5th-RVC-meeting-report.pdf?ua=1 (Accessed 31 Aug 2017)

Авторы:

Топтыгина А.П., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

Смердова М.А., аспирант лаборатории цитокинов ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Наумова М.А., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории прикладной иммунологии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Владимирова Н.П., вирусолог вирусологической лаборатории ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Мамаева Т.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории прикладной иммунологии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Cytokine, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Immunology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

Smerdova M.A., PhD Student, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Naumova M.A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Vladimirova N.P., Virologist, Laboratory of Virology, Centre for Hygiene and Epidemiology in Moscow, Moscow, Russian Federation;

Mamaeva T.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROBACTERIACAE* ISOLATED FROM INTESTINAL MICROBIOTA OF RESIDENTS OF THE REPUBLIC OF GUINEA AND RUSSIA (SAINT PETERSBURG)

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

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

Abstract. It is known that resistant *Enterobacteriaceae* strains can be a part of human microbiota. While colonizing the body of a healthy person, resistant strains do not cause diseases, while the healthy person becomes carrier and source of such strains or the resistance genes to the external environment. The aim of the study was to compare the antimicrobial susceptibility of opportunistic *Enterobacteriaceae* isolated from feces of residents of the Republic of Guinea (121 strains) and Russia, Saint Petersburg (897 strains). The antimicrobial susceptibility was determined by the disc-diffusion method according to the national Russian Clinical Guideline “Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms” using discs and Muller-Hinton agar manufactured by Oxoid. Resistance mechanisms were tested in bacterial strains non-susceptible to beta-lactams using confirmatory phenotypic and molecular tests. Resistant strains were detected significantly more often in the intestinal microbiota of residents of the Republic of Guinea, than of Saint Petersburg (83.5 and 28.7 per 100 strains studied, respectively), including strains with multidrug resistance (47.9 and 11.1, respectively). The residents of the Republic of Guinea have a high frequency of isolation of *Enterobacteriaceae* resistant to “old” antibiotics, which were often used in the 1970s, but rarely used in Russia and other European countries: tetracyclines (63.2), trimethoprim/ sulfamethoxazole (59.5) and aminopenicillins (48.4). The frequency of detection of strains resistant to modern clinically significant antibiotics (extended spectrum cephalosporins, fluoroquinolones, aminoglycosides) was the same in residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg. Resistance to beta-lactams in *Enterobacteriaceae* strains isolated both from the residents of the Republic of Guinea and from Saint Petersburg is due to the same mechanism — the production of beta-lactamases — broad-spectrum and extended spectrum- of various genetic families. This data corresponds to world global trends in the antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae*: resistance to aminopenicillins in *E. coli* is due to the production of broad-spectrum beta-lactamases TEM-1 (80% of strains from residents of the Republic of Guinea and 86.5% from Saint Petersburg), and resistance to extended spectrum cephalosporins — the production of extended spectrum beta-lactamases of the CTX-M1 genetic group (72.7 and 67.6% respectively). Our research has shown that the intestinal microbiota of the inhabitants of different continents (Europe and Africa) contains the strains (*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) resistant to clinically significant antibiotics (beta-lactams) due to single mechanism globally spread in *Enterobacteriaceae*.

Key words: resistance, *Enterobacteriaceae*, Republic of Guinea, intestine microbiota, antimicrobial susceptibility, beta-lactamase, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Адрес для переписки:

Кафтырева Лидия Алексеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-48-83 (служебн.).
E-mail: kafilidia@mail.ru

Contacts:

Lidiiia A. Kaftyreva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-48-83 (office).
E-mail: kafilidia@mail.ru

Библиографическое описание:

Егорова С.А., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Сузаева Л.В., Забровская А.В., Матвеева З.Н., Войтенкова Е.В. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов энтеробактерий, выделенных при изучении микробиоты кишечника жителей Гвинейской Республики и России (Санкт-Петербург) // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 349–354. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-349-354

Citation:

Egorova S.A., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaja A.V., Matveeva Z.N., Voitenkova E.V. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from intestinal microbiota of residents of the Republic of Guinea and Russia (Saint Petersburg) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 349–354. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-349-354

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ИЗУЧЕНИИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЖИТЕЛЕЙ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ И РОССИИ (САНКТ-ПЕТЕРБУРГ)

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

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

Резюме. Известно, что резистентные к антибиотикам штаммы энтеробактерий могут входить в состав микробиоты кишечника. Колонизируя организм здорового человека, устойчивые штаммы не вызывают заболеваний желудочно-кишечного тракта, при этом здоровый человек становится носителем и источником выделения таких штаммов или детерминант резистентности во внешнюю среду. Цель исследования состояла в сравнительной оценке чувствительности к антибиотикам штаммов условно-патогенных энтеробактерий, выделенных из проб испражнений жителей Гвинеийской Республики (121 штамм) и Санкт-Петербурга (897 штаммов). Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» с использованием дисков производства Oxoid. У штаммов бактерий, нечувствительных к бета-лактамам, изучили механизмы резистентности, используя подтверждающие фенотипические тесты и молекулярные методы. У жителей Гвинеийской Республики устойчивые к антибиотикам штаммы в составе микробиоты кишечника выявлены достоверно чаще, чем у жителей Санкт-Петербурга (83,5 и 28,7 на 100 исследованных штаммов соответственно), включая штаммы с множественной резистентностью (47,9 и 11,1 соответственно). У жителей Гвинеийской Республики высока частота выделения штаммов энтеробактерий, устойчивых к «старым» АМП, которые часто применяли в 70-е гг. прошлого столетия, но редко используются в настоящее время в РФ и других европейских странах: тетрациклинам (63,2), триметоприм/сульфаметоксазолу (59,5) и аминопенициллинам (48,4). Частота выявления штаммов, устойчивых к современным клинически значимым антибиотикам (цефалоспорины, фторхинолоны, аминогликозиды) практически не отличалась у жителей Гвинеийской Республики и Санкт-Петербурга. Резистентность к бета-лактамам штаммов, выделенных как у жителей Гвинеийской Республики, так и Санкт-Петербурга, обусловлена практически одним механизмом — продукцией бета-лактамаз широкого и расширенного спектра различных генетических семейств. Выявленные закономерности соответствуют глобальным тенденциям формирования резистентности к антибиотикам у штаммов энтеробактерий в мире: устойчивость к аминопенициллинам у *E. coli* обусловлена продукцией бета-лактамазы широкого спектра TEM-1 (80,0% штаммов от жителей Гвинеийской Республики и 86,5% — Санкт-Петербурга), а устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра — продукцией бета-лактамаз расширенного спектра генетической группы CTX-M1 (72,7 и 67,6% соответственно). Наши исследования показали, что в составе нормальной микробиоты кишечника жителей разных континентов (Европа и Африка) присутствуют бактерии (*K. pneumoniae* и *E. coli*), штаммы которых характеризуются резистентностью к клинически значимым антибиотикам (бета-лактамам), обусловленной единым механизмом, глобально распространенным в популяциях энтеробактерий.

Ключевые слова: резистентность, *Enterobacteriaceae*, Гвинеийская Республика, нормальная микробиота кишечника, чувствительность к антибиотикам, бета-лактамазы, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Introduction

At present, the development of antimicrobial resistance (AMR) of infectious agents has an adverse effect on human health due to a decrease in the clinical effectiveness of etiotropic therapy. Multidrug resistant strains of microorganisms are the cause of severe forms of health-care infections, as well as other infectious diseases (tuberculosis, shigellosis, salmonellosis, typhoid fever). In modern conditions, according to the WHO assessment, the AMR is a global problem that must be overcome without delay. In this regard, in 2015 the World Health Assembly adopted a global plan of action to combat AMR [1]. One of the ways to “contain” antibiotic resistance is to monitor the circulation of resistant strains of microorganisms, as well as genes that determine the AMR. Two spe-

cies of *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) are included in the list of indicator microorganisms which are monitored for resistance to clinically relevant antibiotics, in the EU countries. Particular attention is paid to strains resistant to extended spectrum cephalosporins (ESC) and carbapenems (producing extended spectrum beta-lactamases (ESBL) and carbapenemases) [6].

The results of studies conducted in the Russian Federation in the last decade have shown that resistant strains of *Enterobacteriaceae*, causative agents of both health-care and community-acquired infections, were isolated from various clinical samples in Russian hospitals, especially in intensive care units (ICU). In 2013–2016 in population of nosocomial strains 50–70% of *E. coli* were resistant to ESC and fluoroquinolones, more than 20–30%

were resistant to aminoglycosides. In the population of *K. pneumoniae* the resistance was more pronounced: 80–90% strains were resistant to ESC and fluoroquinolones, more than 60% — to aminoglycosides, carbapenem resistance has appeared (about 10%). High levels of resistance were also observed in strains isolated under community-acquired conditions: about 30% of *E. coli* strains and more than 50% of *K. pneumoniae* strains were resistant to fluoroquinolones (every second strain); about 20% of *E. coli* and 40% *K. pneumoniae* showed resistance to aminoglycosides; the proportion of *K. pneumoniae* strains resistant to carbapenems was about 2% [2, 4, 5, 8]. It is known that resistant *Enterobacteriaceae* strains can be a part of human microbiota. While colonizing the body of a healthy person, resistant strains do not cause diseases, while the healthy person becomes carrier and source of such strains or the resistance genes to the external environment. Strains of various bacteria, carrying the genes responsible for the production of ESBL and carbapenemases, are found in urban wastewater, sewage, soil, feces of agricultural and domestic animals [10].

The aim of the study was to compare the antimicrobial susceptibility of opportunistic *Enterobacteriaceae* strains isolated from feces of residents of the Republic of Guinea and Russia (Saint Petersburg).

Materials and Methods

We studied the antimicrobial susceptibility of 1018 *Enterobacteriaceae* strains isolated in 2015–2016 from feces of residents of the Republic of Guinea (121 strains) and Saint Petersburg (897 strains) [9]. The collection included 604 strains of *E. coli* and 414 strains of other *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Hafnia alvei*). The antimicrobial susceptibility was determined by the disc-diffusion method according to the national Russian Clinical Guideline “Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms” [3] using discs and Muller–Hinton agar manufactured by Oxoid. The following antibiotics were included in the study: aminopenicillins (ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid); ESC (ceftazidime and cefotaxime);

carbapenems (meropenem); quinolones (nalidixic acid and ciprofloxacin); aminoglycosides (gentamicin, tobramycin, amikacin); tetracyclines (tetracycline); nitrofurans (nitrofurantoin); trimethoprim/sulfamethoxazole and chloramphenicol. As many species of *Enterobacteriaceae* have natural resistance to aminopenicillins, susceptibility to these antibiotics was determined only in *E. coli* and *Proteus mirabilis*.

Resistance mechanisms were tested in bacterial strains non-susceptible to beta-lactams using confirmatory tests: phenotypic (a double discs synergy test, the ESBL+AmpC Screen Kit by Rosco Diagnostica, Denmark) and molecular tests (PCR with electrophoretic detection with specific primers to genes encoding beta-lactamases of different molecular classes: TEM, SHV, OXA, CTX-M, AmpC), using the primers and conditions described previously [7], reaction mixture contained 2xTaq Master mix green HS (Alkor Bio, Russia) and the corresponding primers in a final concentration of 0.4 μM.

Results and Discussion

The collection of *Enterobacteriaceae* strains isolated from the inhabitants of the Republic of Guinea and Saint Petersburg was represented by strains susceptible to antibiotics (16.5 and 71.3%, respectively), resistant to 1–2 classes of antibiotics (35.5 and 17.6%, respectively), as well as strains with multiple resistance to 3 or more classes of antibiotics (47.9 and 11.1%, respectively) (Table 1).

The frequency of isolation of resistant strains varied among residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg, depending on the antibiotics (Table 2). All the strains retained susceptibility to carbapenems. In the collection of strains isolated from the inhabitants of the Republic of Guinea, a high frequency of resistance to three classes of antibiotics was noted: tetracyclines — 63.2 per 100 strains studied, trimethoprim/sulfamethoxazole — 59.5 and aminopenicillins — 48.4. Resistance to quinolones was 17.4, to nitrofurans — 12.0, to chloramphenicol — 9.9, to ESC — 9.1 and to aminoglycosides — 6.6. In the collection of strains isolated from residents of Saint Petersburg, the frequency of resistant

Table 1. Resistance phenotypes of *Enterobacteriaceae* isolated from residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg (per 100 strains studied)

Resistance phenotypes	Republic of Guinea (n = 121)			Saint Petersburg (n = 897)		
	n	per 100 strains studied	95% CI	n	per 100 strains studied	95% CI
Susceptible	20	16.5	11.0–24.2	640	71.3	68.3–74.2
Resistant (total):	101	83.5	75.7–89.0	257	28.7	25.8–31.7
– to 1–2 antibiotic classes	43	35.6	27.6–44.4	158	17.6	15.3–20.2
– to 3 and more antibiotic classes	58	47.9	39.2–56.8	99	11.1	9.1–13.3
ESBL-producing	11	9.1	5.2–15.5	68	7.6	6.0–9.5

Table 2. Antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* isolated from residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg (per 100 strains studied)

АМП		Republic of Guinea (n = 121)			Saint Petersburg (n = 897)		
		n	per 100 strains studied	95% CI	n	per 100 strains studied	95% CI
β-lactams	Aminopenicillines ¹	45	46.9 ²	37.2–56.8	96	18.8 ³	15.6–22.4
	ESC	11	9.1	5.2–15.5	68	7.6	6.0–9.5
	Carbapenems	0	0	0–3.1	0	0	0–0.4
Quinolones		21	17.4	11.6–25.1	79	8.8	7.1–10.8
Tetracyclines ¹		74	63.2 ⁴	54.2–71.4	131	14.6	12.4–17.1
Aminoglycosides		8	6.6	3.4–12.5	37	4.1	3.0–5.6
Nitrofurans ¹		14	12.0 ⁴	7.3–19.1	43	4.8	3.6–6.4
Trimethoprim/sulfamethoxazole		72	59.5	50.6–67.8	65	7.2	5.7–9.1

¹ susceptibility of *Enterobacteriaceae* naturally susceptible to this antimicrobials was studied;

² susceptibility of *E. coli* and *Proteus mirabilis* (96 strains) was studied;

³ susceptibility of *E. coli* and *Proteus mirabilis* (511 strains) was studied;

⁴ susceptibility of *Enterobacteriaceae* (117 strains) was studied without *Proteus* spp. naturally resistant to nitrofurans;

ESC — extended spectrum cephalosporins.

strains was significantly lower and was 18.8 and 14.6, respectively, for aminopenicillins and tetracyclines. The strains resistant to other antibiotics were isolated in 4.1–8.8 per 100 strains studied. During study strains resistant to beta-lactams (ampicillin and ESC) were used to detect genes encoding the production of beta-lactamases of frequently occurring molecular classes: TEM, SHV, OXA, CTX- M and AmpC.

As many species of *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Hafnia alvei*) are characterized by natural resistance to aminopenicillins, so their susceptibility to this antibiotics was not evaluated. 141 strains of *E. coli* resistant to aminopenicillins were detected: 45 strains from the inhabitants of the Republic of Guinea and 96 strains from residents of Saint Petersburg. Genes encoding the production of broad-spectrum beta-lactamase

(BSBL) — TEM-1, are found in the overwhelming majority of strains (80.0 and 83.3%, respectively); OXA — in 3 strains (6.7%) isolated from the inhabitants of the Republic of Guinea, and 5 strains (5.2%) isolated in Saint Petersburg; SHV — in one strain isolated in Saint Petersburg. The genes of BSBL of the two molecular classes, TEM and OXA, were simultaneously identified in three strains (3.1%), isolated from the inhabitants of Saint Petersburg. Genes of frequently occurring BSBLs (TEM, SHV, OXA) were not identified in 13 strains characterized, possibly, by other mechanisms of resistance.

A molecular study of 79 strains of *Enterobacteriaceae* resistant to ESC showed that *K. pneumoniae* strains, isolated both from the inhabitants of the Republic of Guinea (2 strains) and from Saint Petersburg (13 strains), possessed the genes of ESBLs

Table 3. Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* (*E. coli* и *K. pneumoniae*), isolated from residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg

Beta-lactamases	Republic of Guinea			Saint Petersburg		
	n	%	95% CI	n	%	95% CI
Strains resistant to aminopenicillins						
Total strains	45	100	–	96	100	–
TEM	36	80.0	66.2–89.1	83	86.5	78.2–91.9
SHV	0	0	0–7.9	1	1.0	0.2–5.7
OXA	3	6.7	2.3–17.9	5	5.2	2.2–11.6
Other BSBLs	6	13.3	6.3–26.2	7	7.3	3.6–14.3
Strains resistant to ESC						
Total strains	11	100	–	68	100	–
TEM	0	0	0–25.9	2	2.9	0.8–10.1
SHV	0	0	0–25.9	2	2.9	0.8–10.1
AmpC CMY	0	0	0–25.9	1	1.5	0.3–7.9
CTX-M, of which:	9	81.8	52.3–94.9	63	92.7	83.9–96.8
– CTX-M1	8	72.7	43.4–90.3	46	67.6	55.8–77.6
– CTX-M9	1	9.1	1.6–37.7	17	25.1	16.2–36.4
Other ESBLs	2	18.2	5.1–47.7	0	0	0–5.3

BSBL — broad spectrum beta-lactamase; ESC — extended spectrum cephalosporines; ESBL — extended spectrum beta-lactamase.

of the CTX-M genetic family, of CTX-M1 genetic group (Table 3). In an overwhelming majority of *E. coli* strains (9 from the inhabitants of the Republic of Guinea and 55 from the inhabitants of Saint Petersburg) we identified genes encoding ESBLs of the CTX-M genetic family (81.8% and 92.7%, respectively) that belonged to two genetic groups: CTX-M1 (72.7 and 67.6%, respectively) and CTX-M9 (9.1 and 25.1%, respectively). Also, *E. coli* strains isolated in Saint Petersburg, discovered genes encoding ESBL production in TEM and SHV genetic families (2,9%), and genes encoding cephalosporinase molecular class C production (AmpC, of the CMY genetic group) in one strain (1.5%). The genes of widespread ESBLs (CTX-M, TEM, SHV, AmpC) were not detected in 2 strains of *E. coli* in the Guinean Republic, possibly characterized by other resistance mechanisms.

Studies have shown that resistant strains of *Enterobacteriaceae* were isolated in the intestinal microbiota of both the residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg. It should be noted that the resistant strains were detected significantly more often in the residents of the Republic of Guinea, than of Saint Petersburg (83.5 and 28.7 per 100 strains studied, respectively), including strains with multidrug resistance (47.9 and 11.1, respectively). The residents of the Republic of Guinea have a high frequency of isolation of *Enterobacteriaceae* resistant to “old”

antibiotics, which were often used in the 1970s, but rarely used in Russia and other European countries to treat infections of different locations: tetracyclines (63.2), trimethoprim/ sulfamethoxazole (59.5) and aminopenicillins (48.4). The frequency of detection of strains resistant to modern clinically significant antibiotics (ESC, fluoroquinolones, aminoglycosides) was the same in residents of the Republic of Guinea and Saint Petersburg. It has been established that the resistance to beta-lactams in *Enterobacteriaceae* strains isolated both from the residents of the Republic of Guinea and from Saint Petersburg is due to one mechanism — the production of beta-lactamases — broad-spectrum and extended spectrum — of various genetic families. This data corresponds to world global trends in the antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae*: resistance to aminopenicillins in *E. coli* is due to the production of broad-spectrum beta-lactamases TEM-1 (80% of strains from residents of the Republic of Guinea and 86.5% from Saint Petersburg), and resistance to ESC — the production of ESBLs of the CTX-M1 genetic group (72.7 and 67.6%, respectively).

Our research has shown that the normal microbiota of the inhabitants of different continents (Europe and Africa) contains the strains (*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*) resistant to clinically significant antibiotics (beta-lactams) due to single mechanism globally spread in *Enterobacteriaceae*.

Список литературы/References

- ВОЗ: Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. [ВОЗ: Global'nyi plan deistvii po bor'be s ustoichivost'yu k protivomikrobnym preparatam [WHO: Global Action Plan on Antimicrobial Resistance]. URL: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254884/1/9789244509760-rus.pdf?ua=1>
- Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С., Ведерникова Н.Б., Морозова О.Т., Смирнова М.В., Попенко Л.Н., Любушкина М.И., Савочкина Ю.А., Макарова М.А., Сужаева Л.В., Останкова Ю.В., Иванова М.Н., Павелкович А.М., Наабер П., Сепп Э., Кыльялг С., Мицюлявичене И., Балодэ А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-бета-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 1. С. 29–36. [Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konovalenko I.B., Piasetskaya M.F., Kurchikova T.S., Vedernikova N.B., Morozova O.T., Smirnova M.V., Popenko L.N., Lyubushkina M.I., Savochkina Yu.A., Makarova M.A., Suzhaeva L.V., Ostankova Yu.V., Ivanova M.N., Pavelkovich A.M., Naaber P., Sepp E., Kulyalg S., Mitsyulyavichine I., Balode A. Strains of Enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamase NDM-1, isolated in hospitals in the Baltic Region. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 29–36. doi: 10.15789/2220-7619-2013-1-29-36 (In Russ.)]
- Определение чувствительности к антимикробным препаратам: клинические рекомендации, версия 2015-2. [Opredelenie chuvstvitel'nosti k antimikrobnym preparatam: klinicheskie rekomendatsii, versiya 2015-2] [Antimicrobial susceptibility testing of microorganisms: russian clinical guidelines, version 2015-2]. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>
- Светличная Ю.С., Колосовская Е.Н., Кафтырева Л.А., Дарьина М.Г., Егорова С.А., Макарова М.А. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014. Т. 1, № 74. С. 9–14. [Svetlichnaya Yu.S., Kolosovskaya E.N., Kaftyreva L.A., Daryina M.G., Egorova S.A., Makarova M.A. Microbiological monitoring in the epidemiological surveillance of hospital infections. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis*, 2014, vol. 1, no. 74, pp. 9–14. (In Russ.)]
- Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013–2014 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2017. Т. 19, № 1. С. 49–56. [Sukhorukova M.V., Eidelshstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Mikotina A.V., Dehnich A.V., Kozlov R.S. Antibiotic resistance of Enterobacteriaceae nosocomial strains in russian hospitals: results of MARATHON, a multicentre epidemiological study, 2013–2014. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, vol. 19, no. 1, pp. 49–56. (In Russ.)]

6. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European EARS-Net 2015. URL: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf>
7. Dallenne C., Da Costa A., Decré D., Favier C., Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important b-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65: 490–495. doi:10.1093/jac/dkp498
8. Pavelkovich A., Balode A., Edquist P., Egorova S., Ivanova M., Kaftyreva L., Konovalenko I., Kõljalg S., Lillo J., Lipskaya L., Miciuleviciene J., Pai K., Parv K., Pärna K., Rööp T., Sepp E., Štšepetova J., Naaber P. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the Baltic Countries and St. Petersburg Area. *BioMed Res. Int.* 2014; ID 548960. doi: 10.1155/2014/548960
9. 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 the microbiome of the intestines of the residents of the Republic of Guinea and Russia. *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 325–330. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-375-382
10. Woodford N., Wareham D.W., Guerra B., Teale C. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014, vol. 69, pp. 287–291. doi: 10.1093/jac/dkt392

Авторы:

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

Authors:

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

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ХИМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У ПОДРОСТКОВ С ИНВАЗИЕЙ ЛЯМБЛИЯМИ

Л.Б. Маснавијева, И.В. Кудаева

ФГБНУ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск, Россия

Резюме. В последние десятилетия лямблиоз занимает второе место в структуре паразитарных заболеваний в России. Инвазия лямблиями ассоциирована с клиническими признаками аллергических реакций, дисбалансом показателей Т- и В-лимфоцитов, изменениями в содержании цитокинов, иммуноглобулинов. Загрязнение воздушной среды химическими соединениями также оказывает воздействие на иммунную систему, стимулирует продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, иммуноглобулинов. Можно предположить, что ответная реакция организма на инвазию лямблиями в условиях химического ингаляционного воздействия будет претерпевать изменения. Цель данного исследования состояла в оценке содержания цитокинов и иммуноглобулинов у подростков с лямблиозом при различной ингаляционной химической нагрузке. В обследование включены 295 подростков 13–16 лет I–III групп здоровья, не имеющих на момент обследования обострения каких-либо заболеваний и жалоб на работу органов желудочно-кишечного тракта. В цельной крови школьников исследовали клеточный состав с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы, в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа изучили содержание антител к лямблиям, IL-2 и IL-10, IFN α и IFN γ , IgA. Для каждого школьника была проведена оценка индивидуальной ингаляционной химической нагрузки веществами, тропными к иммунной системе, с учетом данных о содержании примесей в атмосферном воздухе, воздухе помещений, информации об организации учебного процесса и отдыха учащихся, а также их антропометрических параметров. После оценки уровней антител к лямблиям сформированы группы: I — лица с инвазией лямблиями, II — без таковой. В каждой группе выделены подгруппы с индексом опасности нарушений иммунитета менее 2 и 2 и более. Установлено, что инвазия лямблиями сопровождается изменениями в относительном содержании базофилов и моноцитов, повышением уровней IFN α и IFN γ , IL-2 и IgA при индексах опасности развития патологии иммунной системы менее 2. При паразитарной инвазии у подростков с индексами опасности нарушений иммунитета равным 2 и выше отмечено снижение содержания IgA и IFN γ и отсутствие различий в концентрациях IL-2 и IL-10, IFN α и показателях лейкоцитарной формулы по сравнению с лицами без лямблиоза. Можно предположить, что высокие уровни ингаляционной химической нагрузки, влияя на иммунную систему подростков, создают предпосылки для недостаточности защитных механизмов и персистенции лямблий.

Ключевые слова: подростки, иммунная система, цитокины, иммуноглобулины, лейкоциты, лямблии, загрязнение воздушной среды.

Адрес для переписки:

Маснавијева Людмила Борисовна
665827, Россия, г. Ангарск, 12-й микрорайон, 3, а/я 1170.
Тел.: 8 (3955) 55-96-63 (служебн.); 8 914 003-19-76 (моб.).
E-mail: Masnavieva_Luda@mail.ru

Contacts:

Liudmila B. Masnavieva
665827, Russian Federation, Angarsk, Mikrorayon 12a, 3,
PO Box 1170.
Phone: +7 (3955) 55-96-63 (office); +7 914 003-19-76 (mobile).
E-mail: Masnavieva_Luda@mail.ru

Библиографическое описание:

Маснавијева Л.Б., Кудаева И.В. Модифицирующее влияние ингаляционной химической нагрузки на содержание цитокинов и иммуноглобулинов у подростков с инвазией лямблиями // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 355–360. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-355-360

Citation:

Masnavieva L.B., Kudaeva I.V. Modifying effect of inhalation chemical load on the content of cytokines and immunoglobulins in adolescents with lamblia infection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 355–360. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-355-360

MODIFYING EFFECT OF INHALATION CHEMICAL LOAD ON THE CONTENT OF CYTOKINES AND IMMUNOGLOBULINS IN ADOLESCENTS WITH LAMBLIA INFECTION

Masnavieva L.B., Kudaeva I.V.

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation

Abstract. Giardiasis ranks second in the structure of parasitic diseases in Russia of the last decade. Infestation *Giardia* is associated with clinical signs of allergic reactions, imbalance parameters of the T- and B-lymphocytes, changes in the concentration of cytokines and immunoglobulins. Air pollution by chemical compounds also affects the immune system, stimulates production of pro- and anti-inflammatory cytokines, immunoglobulins. It can be assumed that the response of the organism to lamblia invasion will undergo changes under conditions of chemical inhalation exposure. The purpose of this study was to evaluate the content of cytokines and immunoglobulins in adolescents with giardiasis with an inhalation chemical load. 295 adolescents aged 13–16 with I–III health groups who did not have any at the time of the examination, exacerbation of any diseases and complaints of the work of gastrointestinal organs were included in the survey. Cellular blood composition with differential count of the leukocyte formula were studied in schoolchildren. The content of antibodies to lamblia, interleukins-2 and -10, interferons-alpha and-gamma, immunoglobulins A were studied in the blood serum by the method of enzyme immunoassay. Evaluation of individual inhalation chemical load by substances tropic to the immune system was carried out for each person. Data on the content of impurities in ambient air, indoor air, information on the organization of educational process and rest of students and their anthropometric parameters were taken into account when calculating chemical loads. Groups were formed after evaluation of antibodies to lamblia. Persons with *Giardia* invasion made up group I, school children without giardiasis were included in group II. Subgroups with a hazard index of immunity less than 2, 2 or more selected in each group. It has been established that changes in the relative content of basophils and monocytes, an increase in the levels of interferons-alpha and gamma, interleukin-2 and immunoglobulin A in adolescents with giardiasis occur at indexes of the development of pathology of the immune system less than 2. Adolescents with hazard indices of immunity equal to 2 or more decreased the content of immunoglobulin A and interferon-gamma and no differences in concentrations of interleukin-2 and -10, interferon-alpha and indicators of leukogram with parasitic infestation, compared to persons without giardiasis. It can be assumed, that high levels of inhalation chemical load, affecting the immune system of adolescents, create the prerequisites for the deficiency of protective mechanisms and the lamblia persistence.

Key words: *adolescents, immune system, cytokines, immunoglobulins, leukocytes, Giardia, air pollution.*

Согласно данным ВОЗ, ежегодно в мире лямблиозом заражается около 200 млн человек, в России регистрируется более 130 тыс. случаев лямблиоза, который последние десятилетия занимает второе место в структуре паразитарных заболеваний [2, 4]. Лямблиоз может протекать бессимптомно или с манифестацией, со спонтанной или обусловленной специфической терапией элиминацией паразитов [1, 12]. Глистно-паразитарные инвазии, оказывая воздействие на органы и системы, способствуют более частому обострению хронических и возникновению соматических заболеваний [8, 14]. Доказано, что паразитоносительство ассоциировано с клиническими признаками аллергических реакций, дисбалансом показателей Т- и В-лимфоцитов, снижением уровня Т-популяционного состава и В-клеток, изменениями в содержании цитокинов и иммуноглобулинов [6, 9, 12, 13, 17]. Также доказано, что загрязнение воздушной среды химическими соединениями оказывает воздействие на иммунную систему, стимулирует продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, иммуноглобулинов, вызывает развитие адаптационных или дезадаптационных процессов [3, 15, 18]. Следовательно, ответная

реакция иммунной системы на инвазию лямблиями может претерпевать изменения в условиях ингаляционной нагрузки химическими соединениями.

Цель данного исследования состояла в оценке содержания цитокинов и иммуноглобулинов у подростков с лямблиозом при ингаляционной химической нагрузке.

Материалы и методы

В обследование включены 295 подростков 13–16 лет I–III групп здоровья после подписания их родителями или законными представителями информированного согласия. Школьники на момент обследования не имели обострения каких-либо заболеваний, а также не предъявляли жалоб на работу органов желудочно-кишечного тракта.

У детей натошак производился забор крови. В цельной крови исследовали клеточный состав с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови было изучено содержание антител к лямблиям (IgA, IgM, IgG), интерлейкинов-2 и -10 (IL-2, IL-10), интерферо-

нов-альфа и -гамма ($IFN\alpha$, $IFN\gamma$), иммуноглобулина А (IgA) при помощи соответствующих тест-наборов («Вектор-БЕСТ», Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Индивидуальную химическую нагрузку оценивали по индексу опасности формирования патологии иммунной системы (НИ), рассчитанному в соответствии с Руководством по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду [10] с учетом данных о содержании примесей в атмосферном воздухе, воздухе жилых и учебных помещений, информации об организации учебного процесса и отдыха учащихся, а также их антропометрических и спирометрических параметров [7].

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета прикладных программ «Statistica 6.0», с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Известно, что специфические антитела различных классов Ig к антигенам лямблий в крови выявляются не только при манифестной, но и бессимптомной инфекции, а также после перенесенной болезни в недавнем прошлом. В результате проведенного исследования установлено, что 93 подростка имели инвазию лямблиями. Эти школьники составили группу I, остальные (202 человека) — группу II.

Далее была проведена оценка индивидуальной ингаляционной химической нагрузки ве-

ществами, имеющими тропность к иммунной системе. Минимальное значение персонифицированного НИ формирования патологии иммунной системы составило 0,86, максимальное — 3,91. В соответствии с НИ развития нарушений иммунитета в каждой из групп было выделено 2 подгруппы. В подгруппу 1 включили подростков с $НИ < 2$, в подгруппу 2 — лица с $НИ \geq 2$.

При изучении содержания цитокинов у подростков с инвазией лямблиями и без таковой, имеющих НИ нарушений иммунитета менее 2, было установлено, что паразитоносительство сопровождалось более высоким уровнем $IL-2$ (4,17 (1,56–6,86) пг/мл, $p = 0,009$), чем у лиц без такового (1,45 (0,01–4,40) пг/мл) (рис. 1А). Превышение референтной границы данного показателя (0–10 пг/мл) выявлено в 6,06 и 10,00% соответственно ($p = 0,484$). Содержание $IL-10$ в крови школьников группы I было незначительно выше (2,92 (0,14–6,03) пг/мл, $p = 0,083$), чем в группе II (0,96 (0,00–3,51) пг/мл), его повышенные значения (более 10 пг/мл) были отмечены в 10,0 и 12,5% случаев соответственно ($p = 0,778$). У подростков с лямблиозом уровни $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ были выше (5,24 (1,43–17,14) пг/мл, $p < 0,005$ и 3,93 (1,07–6,36) пг/мл, $p = 0,017$ соответственно), чем у их сверстников без этого заболевания (0,06 (0,01–4,29) пг/мл и 1,43 (0,01–5,08) пг/мл соответственно). Доля лиц с концентрацией $IFN\alpha$, превышающей референтные значения (0–5 пг/мл), в группе I была выше, чем в группе II (43,33 и 22,58% соответственно, $p = 0,049$). Уровни $IFN\gamma$ выше референтной границы (0–10 пг/мл) выявлены у 3–5% обследованных подростков ($p = 0,658$). Для школьников группы I были характерны более вы-

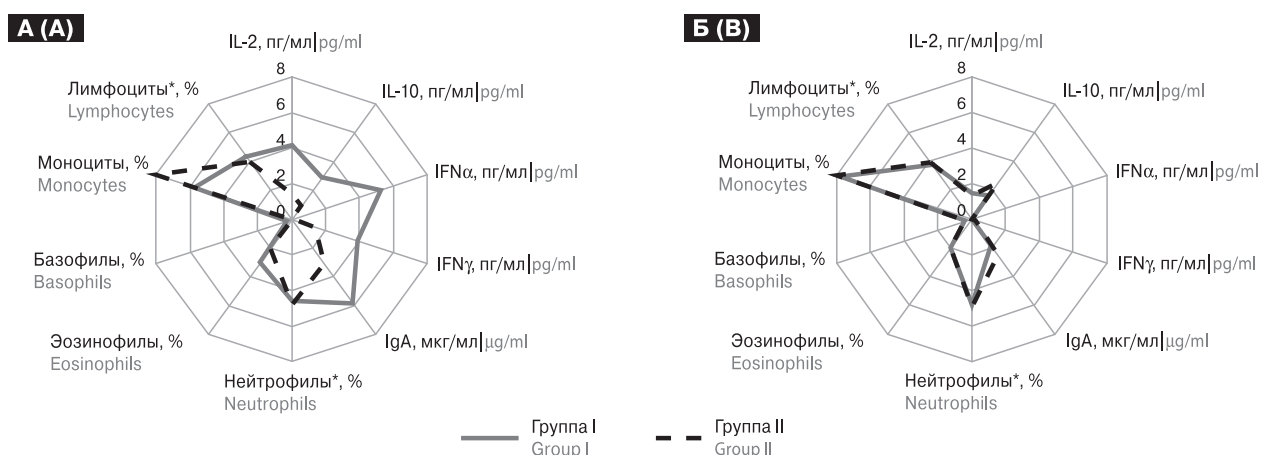


Рисунок. Показатели иммунной системы подростков с инвазией лямблиями при индексе опасности нарушений иммунитета менее 2 (А), равным 2 и более (Б)

Figure. Indicators of the immune system of adolescents with *Giardia* infestation in the hazard index of immunity less than 2 (A) equal to 2 or more (B)

Примечание: * — на графике значения показателей уменьшены в 10 раз.

Note: * — values are reduced 10 times in figure.

сокие уровни IgA по сравнению с группой II (5,84 (4,31–8,00) мкг/мл и 3,07 (1,48–4,89) мкг/мл соответственно, $p < 0,05$). Данные различия обусловлены тем, что среди подростков с $HI \geq 2$ доля лиц с его повышенными концентрациями (53,33%) была больше, а с пониженными — меньше (3,33%), чем в группе II (22,92%, $p = 0,005$ и 36,07%, $p = 0,001$ соответственно). Анализ показателей лейкоцитарной формулы позволил установить, что относительное содержание моноцитов у подростков группы I было ниже (5,75 (4,00–7,50)%, $p = 0,001$), чем у школьников группы II (8,00 (6,00–9,00)%), количество базофилов у лиц с лямблиозом было выше (0,25 (0,00–1,00)%, $p = 0,10$), по сравнению с подростками, не имевшими данного заболевания (0,00 (0,00–0,00)%).

У подростков с $2 \leq HI$ различий в содержании IL-2, IL-10, а также их частоте отклонений от референтных уровней между группами лиц с лямблиозом и без такового установлено не было (рис. 1B). В группе I уровень IL-2 составил 1,42 (0,01–3,29) пг/мл, в группе II — 1,29 (0,01–3,42) пг/мл ($p = 0,962$). Значения IL-10 в этих же группах равны 1,59 (0,01–6,71) пг/мл и 2,55 (0,54–5,11) пг/мл ($p = 0,233$) соответственно. Доля лиц с повышенной концентрацией IL-2 в группах школьников с инвазией лямблиями и без таковой составила 5,26 и 4,38% ($p = 0,893$), превышение референтных уровней IL-10 выявлено в 14,89 и 7,60% ($p = 0,139$) соответственно. Содержание IFN α в изучаемых группах не различалось ($p = 0,624$) и составило 0,001 (0,01–1,40) пг/мл и 0,01 (0,01–1,39) пг/мл для I и II групп соответственно. Межгрупповых различий в частоте встречаемости повышенных концентраций данного показателя не выявлено (3,38 и 10,67%, $p = 0,310$). Уровень IFN γ у школьников группы I был ниже (0,01 (0,01–0,61) пг/мл, $p = 0,003$), чем у их сверстников из группы II (0,22 (0,01–3,00) пг/мл), в обеих подгруппах значения данного показателя у всех обследованных находились в пределах референтного диапазона. Концентрация IgA у подростков с инвазией лямблиями была ниже (1,85 (1,26–2,43) мкг/мл, $p = 0,001$), чем у их сверстников без лямблиоза (2,48 (1,65–4,19) мкг/мл). У 46,67% обследованных лиц из группы I значения IgA были ниже референтных границ, и лишь у 7,14% — выше нормы, в группе II пониженные значения данного показателя встречались в 26,29%, ($p = 0,003$), повышенные — в 17,88% случаев ($p = 0,010$). При анализе относительного содержания субпопуляций лейкоцитов у школьников с HI развития патологии иммунной системы с лямблиозом и без данного заболевания различий выявлено не было.

Обсуждение

Данные литературы свидетельствуют, что инвазия лямблиями запускает развитие реакций гиперчувствительности немедленного и замедленного типов; реализуется смешанный ответ Th1 и Th2 типа [5, 16]. Развитие острой формы лямблиоза сопровождается снижением количества лимфоцитов [6]. Однако при хронической лямблиозной инвазии по мере ее продолжительности происходит смена антигенов, сопровождающаяся повышением иммуногенности, что может стать причиной аллергического воспаления в сочетании с цитотоксическим или иммунологическим и обусловить разнообразие ответной реакции организма [5].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что увеличение количества базофилов, повышение уровней показателей противовирусной защиты и провоспалительных цитокинов (IFN α , IFN γ , IL-2), а также IgA, являющегося блокатором адгезии бактерий, вирусов и простейших к поверхности слизистой оболочки эпителия [11], указывают на развитие адекватной ответной реакции организма на инвазию паразитами. При этом указанные выше изменения наблюдались только при HI развития патологии иммунной системы менее 2.

При более высоких ингаляционных нагрузках химическими соединениями, различия в уровнях цитокинов у школьников с лямблиозом и без такового нивелируются или наблюдается инверсия ответа. Так среди подростков с инвазией лямблиями при $HI < 2$ около половины имели повышенные уровни IgA и каждый четвертый — высокое содержание IFN γ , при увеличении HI — каждый второй школьник имел пониженные концентрации IgA и отсутствие повышенных уровней IFN γ . Известно, что в норме при попадании паразитов в организм, происходит нарастание концентрации IgA, но лямблии способны вырабатывать IgA-протеазы, разрушающие иммуноглобулины данного класса, что может привести к персистенции лямблий. Хронизации процесса также способствует транзиторный дефицит IgA, который может быть вызван воздействием факторов внешней среды [11, 12]. Следовательно, высокие уровни ингаляционной химической нагрузки, влияя на иммунную систему подростков, создают предпосылки для недостаточности защитных механизмов и персистенции лямблий.

Заключение

Таким образом, наличие инвазии лямблиями вызывает развитие адекватной иммунологической реакции, заключающейся в повышении содержания IgA, IL-2, IFN α и IFN γ и сдвигах в лей-

коцитарной формуле, при индексах опасности развития патологии иммунной системы менее 2. Наличие паразитарной инвазии у подростков, подверженных более высокой ингаляционной нагрузке химическими веществами, тропными к иммунной системе, сопровождается угнетением синтеза IgA и IFN γ . Полученные результаты свидетельствуют, что загрязнение воздушной

среды иммуотропными веществами оказывает модифицирующее влияние на иммунологические реакции, развивающиеся в организме подростков в ответ на инвазию лямблиями. В связи с этим необходим персонифицированный подход к проведению профилактических и лечебных мероприятий, направленных на сохранение здоровья данной категории населения.

Список литературы/References

1. Бандурина Т.Ю., Кнорринг Г.Ю. Проблемы диагностики и лечения лямблиоза у детей // Terra Medika. 2003. № 4. С. 23–27. [Bandurina T.Ju., Knorring G.Ju. Problems of diagnosis and treatment of giardiasis in children. *Terra Medika*, 2003, no. 4, pp. 23–27. (In Russ.)]
2. Бобырева Н.С., Дегтева Г.Н. Анализ данных лабораторного обследования на лямблиоз у различных групп населения Ненецкого автономного округа // Инфекция и иммунитет 2015. Т. 5, № 3. С. 279–284. [Bobyreva N.S., Degteva G.N. Laboratory testing results Analysis of giardiasis prevalence among different population groups in the Nenets autonomous district. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 279–284. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-279-284 (In Russ.)]
3. Бодиенкова Г.М., Колесникова Л.И., Тимофеева С.С. Иммунореактивность населения и качество окружающей среды Прибайкалья. Иркутск: Восточно-Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН. Иркутск, 2006. 222 с. [Bodienkova G.M., Kolesnikova L.I., Timofeeva S.S. Immunoreaktivnost' naseleniya i kachestvo okruzhayushchei sredy Pribaikal'ya [Immunoreactivity of the population and the quality of the environment of the Baikal region]. *Irkutsk: Vostochno-Sibirskiy nauchnyy tsentr ekologii cheloveka SO RAMN. Irkutsk*, 2006. 222 p.]
4. Захарова И.Н., Авдюхина Т.И., Бережная И.В., Зайденварг Г.Е., Skorobogatova E.V. Лямблиоз у детей: что нового? // Медицинский совет. 2015. № 14. С. 59–63. [Zakharova I.N., Avdyukhina T.I., Berezhnaya I.V., Zaidenvarg G.E., Skorobogatova E.V. Giardiasis in children: what's new? *Medicinskii совет = Medical Council*, 2015, no. 14, pp. 59–63. (In Russ.)]
5. Куимова И.В., Рычкова Н.А., Казначеева Л.Ф., Козлов В.Л., Сенников С.В. Воспалительные реакции при лямблиозной инвазии // Сибирское медицинское обозрение. 2001. № 2 (20). С. 13–15. [Kuimova I.V., Rychkova N.A., Kaznacheeva L.F., Kozlov V.L., Sennikov S.V. Inflammatory reactions in giardiasis invasion. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2001, no. 2 (20), pp. 13–15. (In Russ.)]
6. Куропатенко М.В., Азамова З.Ш., Шpileвая Т.И. Влияние паразитарных инфекций на иммунный статус в период беременности // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 7. С. 62–64. [Kuropatenko M.V., Azamova Z.S., Shpilevaya T.I. parasites influence on the immune status during pregnancy. *Sibirskij Medicinskij Zurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2008, no. 7, pp. 62–64. (In Russ.)]
7. Маснабиева Л.Б., Ефимова Н.В., Кудяева И.В. Индивидуальные риски здоровью подростков, обусловленные загрязнением воздушной среды, и их связь с уровнями специфических аутоантител // Гигиена и санитария. 2016. № 8. С. 738–743. [Masnavieva L.B., Efimova N.V., Kudaeva I.V. Individual risks to adolescent health, caused by contaminating the air, and their relationship with the levels of specific autoantibodies. *Gigiya i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2016, no. 8, pp. 738–743. doi: 10.18821/0016-9900-2016-95-8-738-742 (In Russ.)]
8. Озерецковская Н.Н. Органная патология в хронической стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2000. № 4. С. 9–14. [Ozerckovskaja N.N. Organ pathology in the chronic stage of tissue helminthiasis: the role of eosinophilia of blood and tissues, immunoglobulinemia E, G4 and factors inducing an immune response. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2000, no. 4, pp. 9–14.]
9. Решетников О.В., Денисов М.Ю., Курилович С.А. Лямблиоз у подростков: сероэпидемиологическое исследование // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2015. Т. 13, № 2. С. 18–24. [Reshetnikov O.V., Denisov M.Yu., Kurilovich S.A. Giardiasis in adolescents: a seroepidemiologic study. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina = Bulletin of Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*, 2015, vol. 13, no. 2, pp. 18–24.]
10. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. Р2.1.10.1920-04. Москва: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 143 с. [Rukovodstvo po otsenke riska dlya zdorov'ya naseleniya pri vozdeistvii khimicheskikh veshchestv, zagryaznyayushchikh okruzhayushchuyu sredu. Р2.1.10.1920-04 [Human health risks assessment from environmental chemicals. R2.1.10.1920-04]. *Moscow: Federal Center for Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health*, 2004, 143 p.]
11. Усенко Д.В., Конаныхина С.Ю. Современные аспекты диагностики и лечения лямблиоза // Вопросы современной педиатрии. 2015. Т. 14, № 1. С. 108–113. [Usenko D.V., Konanykhina S.Yu. Modern aspects of giardiasis diagnosis and treatment. *Voprosy sovremennoj pediatrii = Current Pediatrics*, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 108–113. (In Russ.)]
12. Чебуркин А.А. Крапивница и паразитарные инвазии у детей: есть ли взаимосвязь? (Часть 2) // Аллергология и иммунология в педиатрии. 2013. Т. 34, № 3. С. 8–11. [Cheburkin A.A. Urticaria and parasitic infection at children: whether there is a correlation? (Part 2). *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergy and Immunology in Pediatrics*, 2013, vol. 34, no. 3, pp. 8–11. (In Russ.)]
13. Bayraktar M.R., Mehmet N., Durmaz R. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients infected with *Giardia lamblia*. *Turkiye Parazit. Derg.*, 2005, vol. 29, no. 3, pp. 160–162.

14. De Almeida M.M., Arede C., Marta C.S., Pinto P.L., Daniel I., Peres I., Nogueira J.A., Pinto J.R. Atopy and enteroparasites. *Allergie et Immunologie*, 1998, vol. 30, no. 9, pp. 291–294.
15. Hajat A., Allison M., Diez-Roux A.V., Jenny N.S., Jorgensen N.W., Szpiro A.A., Vedal S., Kaufman J.D. Long-term exposure to air pollution and markers of inflammation, coagulation, and endothelial activation: a repeat-measures analysis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Epidemiology*, 2015, vol. 26, no. 3, pp. 310–320. doi: 10.1097/EDE.0000000000000267
16. Jiménez J.C., Fontaine J., Creusy C., Fleurisse L., Grzych J.M., Capron M., Dei-Cas E. Antibody and cytokine responses to Giardia excretory/secretory proteins in Giardia intestinalis-infected BALB/c mice. *Parasitol. Res.*, 2014, vol. 113, no 7, pp. 2709–2718. doi: 10.1007/s00436-014-3927-4
17. Matowicka-Karna J., Dymicka-Piekarska V., Kemona H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with Giardia intestinalis. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2009, vol. 47, no. 1, pp. 93–97. doi: 10.2478/v10042-009-0013-3
18. Mostafavi N., Vlaanderen J., Chadeau-Hyam M., Beelen R., Modig L., Palli D., Bergdahl I.A., Vineis P., Hoek G., Kyrtopoulos S.A., Vermeulen R. Inflammatory markers in relation to long-term air pollution. *Environ. Int.*, 2015, vol. 81, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.envint.2015.04.003

Авторы:

Маснабиева Л.Б., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск, Россия;

Кудяева И.В., д.м.н., доцент, зам. директора по научной работе ФГБНУ Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований, г. Ангарск, Россия.

Authors:

Masnavieva L.B., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular-Genetic Researches in Hygiene, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation;

Kudyaeva I.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Deputy Director for Science, East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.02.2018
Отправлена на доработку 12.03.2018
Принята к печати 13.06.2018

Received 15.02.2018
Revision received 12.03.2018
Accepted 13.06.2018

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ БОЛЬНЫХ КОКЛЮШЕМ

А.С. Пименова¹, О.Ю. Борисова^{1,2}, М.С. Петрова¹, И.С. Воронина¹, А.Б. Борисова²,
О.В. Шамшева², С.С. Афанасьев¹, Е.В. Власов³, В.А. Алешкин¹

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

³ ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Цель исследования: оценка эффективности применения оптимизированного нами способа генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) при обследовании больных с подозрением на коклюш в клинических условиях. *Материалы и методы.* Проведено обследование 262 пациентов в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, госпитализированных в ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗМ. Взятие патологического материала проводили согласно МР 3.1.2.0072-13 с задней стенки ротоглотки. Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили с помощью тест-системы «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ». Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР-РВ с помощью набора «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (метод сравнения) и методом LAMP с помощью электрофореза и интеркалирующего красителя. *Результаты.* При использовании оптимизированного нами способа, ДНК *B. pertussis* обнаружена у 252 (96,2%) больных. Метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша — ДНК *B. pertussis* обнаружена у всех пациентов с тяжелой формой, в 95,8% случаев — у пациентов со среднетяжелой и в 95,3% случаев — у пациентов с легкой формой. ДНК *B. pertussis* обнаружена в пробах клинического материала, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — от 92,3% на 1-й неделе до 96% случаев — на 5-й и более неделях заболевания. ДНК *B. pertussis* обнаружена в высоком проценте случаев (96,7–95,9%) и не зависела от приема антибактериальных препаратов. Дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш, так как имеют наиболее высокий риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения. При обследовании 169 детей от 0 до 12 месяцев с помощью оптимизированного метода LAMP, ДНК *B. pertussis* обнаружена в 98,6% случаев у детей, больных коклюшем, в возрасте от 0–3 месяцев, в 98,4% случаев — у детей 4–7 месяцев и в 94,6% случаев — у детей 8–12 месяцев. Эффективность обнаружения ДНК возбудителя у больных коклюшем детей в возрасте до 1 года с помощью оптимизированного метода LAMP составила 97,6%.

Ключевые слова: коклюш, изотермальная амплификация, пациенты, возраст, период болезни.

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского.
Тел.: 8 (499) 747-64-84 (служебн.); 8 916 147-19-60 (моб.).
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Borisova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology
and Microbiology.
Phone: +7 (499) 747-64-84 (office); +7 916 147-19-60 (mobile).
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: olgborisova@mail.ru

Библиографическое описание:

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Петрова М.С., Воронина И.С.,
Борисова А.Б., Шамшева О.В., Афанасьев С.С., Власов Е.В.,
Алешкин В.А. Эффективность применения изотермической
амплификации при обследовании больных коклюшем // Инфекция
и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 361–368. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
3-361-368

Citation:

Pimenova A.S., Borisova O.Yu., Petrova M.S., Voronina I.S., Borisova A.B.,
Shamsheva O.V., Afanasiev S.S., Vlasov E.V., Aleshkin V.A. Efficiency
of application of isothermal amplification at inspection of patients with
whooping cough // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 361–368. doi: 10.15789/2220-7619-2018-
3-361-368

EFFICIENCY OF APPLICATION OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION AT INSPECTION OF PATIENTS WITH WHOOPING COUGH

Pimenova A.S.^a, Borisova O.Yu.^{a,b}, Petrova M.S.^a, Voronina I.S.^a, Borisova A.B.^b, Shamsheva O.V.^b, Afanasiev S.S.^a, Vlasov E.V.^c, Aleshkin V.A.^a

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

^c Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Abstract. Purpose: efficiency isothermal amplification (LAMP) at inspection of patients with whooping cough in clinical conditions. *Materials and methods.* Examination of 262 patients aged from 0 months up to 30 years hospitalized in Infectious diseases clinical hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare is conducted. Clinical specimens (pharyngeal swabs) were collected according to MR 3.1.2.0072-13. Extraction DNA of *B. pertussis* was carried out by means of the AmplyPrime[®] DNA-sorb-AM. Identification of specific fragments of a genome of *B. pertussis* was performed by PCR-real time by means of the AmplySens[®] Bordetella Multi-FL set (a comparison method) and by the LAMP with a phoresis and intercalating dye. *Results.* When using of the optimized method LAMP the DNA of *B. pertussis* is found at 252 (96.2%) patients. The method was effective at any forms of whooping cough — DNA of *B. pertussis* is found in all patients with a severe form, in 95.8% of cases — in patients with medium-weight and in 95.3% of cases — in patients with an easy form. The DNA of *B. pertussis* is found in clinical specimens received from patients on different terms from the beginning of a disease — from 92.3% on the 1st week up to 96% of cases — on the 5th and more weeks of a disease. The DNA of *B. pertussis* is found in high percent of cases (96.7–95.9%) and did not depend on acceptance of antibacterial therapy. Children till 1 year are the main age group which is subject to hospitalization at suspicion of whooping cough and in which the highest risk of development of complications and severe forms of a clinical disease. At inspection of 169 children from 0 to 12 months by means of the optimized method LAMP, DNA of *B. pertussis* it is found in 98.6% of cases in children of patients with whooping cough aged from 0–3 months, in 98.4% of cases — children of 4–7 months and in 94.6% of cases — at children have 8–12 months. The efficiency of detection of DNA of *B. pertussis* at patients with whooping cough of children aged till 1 year by means of the optimized LAMP method was 97.6%.

Key words: whooping cough, isothermal amplification, patients, age, period of disease.

Введение

За последние 5 лет на территории Российской Федерации, эпидемический процесс коклюша характеризуется стабилизацией заболеваемости с колебанием показателей в пределах 3,2 (2015 г.) — 5,6 (2016 г.) — 3,7 (2017 г.) на 100 тыс. населения (<http://www.rosпотреbnadzor.ru>). В 2017 г. зарегистрировано 5415 случаев заболевания коклюшем, в том числе у детей до 17 лет — 5198 случаев. Спорадический уровень заболеваемости 3–5 на 100 тыс. населения стал возможным благодаря многолетнему высокому охвату профилактическими прививками декретированного детского населения (более 95%). Сопоставление экстенсивных и интенсивных показателей заболеваемости по нашей стране за последние годы свидетельствует о преобладании в структуре заболевших школьников 7–14 лет — 41,4% (показатель колеблется от 37 до 60% по территориям), что объясняется многочисленностью группы школьников по сравнению с другими возрастными группами детского населения (<http://www.rosпотреbnadzor.ru>). Однако по интенсивности, практически повсеместно, преобладает группа детей до 1 года, показатель заболеваемости которой превышает в 3–4 раза уровень заболеваемости школьников, что позволяет отнести ее к группе высокого риска заболеваемости.

С 2014 г. согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 3.1.2.3162-14) «Профилактика коклюша», при обследовании больных

с подозрением на коклюш регламентировано применение молекулярно-генетического метода, который является наиболее эффективным по сравнению с бактериологической и серологической диагностикой. На территории РФ зарегистрирован один набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша и бронхисептикоза методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) «АмплиСенс[®] Bordetella multi-FL» [4]. Вместе с тем применение тест-систем в формате ПЦР-РВ сопряжено с рядом недостатков: высокая стоимость исследования и квалификация персонала, необходимость в приобретении дорогостоящего оборудования и иногда возникающие сложности при интерпретации полученных результатов, что требует проведения повторного исследования. Поэтому разработка альтернативных, более простых и надежных методов и тест-систем, направленных на выявление ДНК *Bordetella pertussis*, остается перспективным направлением по улучшению диагностики коклюша, в том числе и в направлении снижения стоимости самого исследования, что экономически целесообразно для региональных лабораторий с разными системами финансирования.

В 2000 г. японскими учеными предложена технология амплификации нуклеиновых кислот — петлеобразующая изотермическая амплификация (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [26], которая позже была реализована при разработке диагностических тест-систем

для лабораторной диагностики большого числа возбудителей инфекционных заболеваний [25]. Она обладает высокой чувствительностью, специфичностью и амплификационной эффективностью за счет использования нескольких пар праймеров на один фрагмент генома и биологических особенностей ДНК-полимеразы, и не требует использования дорогостоящего оборудования. Нами был оптимизирован метод ускоренной генодиагностики коклюша на основе этой технологии с оценкой аналитической чувствительности, специфичности, надежности и валидности теста. Целью настоящей работы явилась оценка эффективности применения оптимизированного нами способа генодиагностики на основе изотермической амплификации (LAMP) при обследовании больных с подозрением на коклюш в клинических условиях.

Материалы и методы

Исследовано 524 пробы клинического материала, полученные при обследовании больных с подозрением на коклюш и контактных с ними лиц, госпитализированных в ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ»).

Взятие клинического материала с задней стенки ротоглотки производили двумя стерильными одноразовыми сухими коммерческими тампонами («Сорап», Италия) с последующим их помещением в пробирку типа эппендорф с физиологическим раствором; доставку и подготовку биологического материала к исследованию осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями МР 3.1.2.0072-13 «Диагностика коклюша и паракоклюша». Экстракцию ДНК *B. pertussis* из исследуемых образцов проводили согласно инструкции по применению комплекта реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» (ООО «НекстБио», Москва).

Специфические фрагменты генома возбудителя коклюша выявляли оптимизированным нами методом изотермической амплификации (LAMP). Приготовление реакционной смеси проводили путем смешивания двух смесей. Состав смеси № 1: 10х реакционный буфер, 2 mM смесь нуклеотидов (dNTP), 25 mM MgCl₂, раствор Betaine. В реакции использовали три пары праймеров, последовательности которых были ранее опубликованы [16]. Состав смеси № 2: рабочее разведение (1:9) Bst ДНК-полимеразы в буферном растворе. В смесь № 1 вносили пробы ДНК и минеральное масло. Затем прогревали в течение 5 мин и охлаждали в течение 1 мин. После чего в каждую пробу вносили смесь № 2, перемешивали на вортексе. В качестве положительного контроля амплификации использовали ДНК штамма *B. pertussis* № 143 (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора,

Оболенск). Амплификацию выполняли в изотермических условиях: 65°C — 60 мин; 80°C — 2 мин. Детекцию продуктов амплификации осуществляли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (Lonza, США) в 50х TAE-буфере (Thermo Fisher Scientific, Литва) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США) с применением источника питания Power Supply Model 2002/2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Продукты амплификации смешивали с 6х DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Литва) и 10 000х SYBR Green I (Lumiprobe GmbH, Германия), после чего образцы помещали в лунки 1,5% агарозного геля. Электрофорез проводили в режиме 160 В 60 мин. Продукты амплификации визуализировали с помощью геледокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция). Также детекцию продуктов амплификации проводили с помощью интеркалирующего красителя. Для этого в каждую пробу вносили по 10 мкл 10 000х SYBR Green I. Результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки.

Выявление специфических фрагментов генома возбудителя коклюша осуществляли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в соответствии с инструкцией по применению набора реагентов «АмплиСенс® Bordetella multi-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения к прибору для проведения ПЦР в режиме «реального времени» Rotor-Gene Q5 plex HRM («Qiagen GmbH», Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ SPSS 19.0. Для признаков, имеющих распределение, отличное от нормального, данные представлены в виде медианы. Статистическая значимость различий качественных признаков в независимых сравниваемых группах оценивалась при помощи критерия χ^2 Пирсона [1, 3].

Результаты

Оптимизированный нами метод генодиагностики коклюша позволяет выявлять ДНК *B. pertussis* в клиническом материале с детекцией методом электрофореза и с помощью интеркалирующего красителя. Идентификацию ДНК *B. pertussis* проводили путем сравнения электрофоретической подвижности полученных фрагментов ДНК с подвижностью контрольного образца ДНК штамма *B. pertussis*. Если у исследуемого ДНК-образца имелись специфические светящиеся профили, аналогичные профилю контрольного штамма *B. pertussis* № 143, то данные образцы регистрировались как содержащие ДНК штамма *B. pertussis* (рис., А, III обложка).

При использовании интеркалирующего красителя результаты амплификации оценивали визуально по изменению цвета содержимого пробирки. Положительными считали те пробы, в которых регистрировали светло-зеленое окрашивание, отрицательные образцы имели светло-оранжевое окрашивание (рис., Б, III обложка).

С целью подтверждения диагноза «Коклюш» с помощью оптимизированного способа проведено обследование 262 пациентов в возрасте от 0 месяцев до 30 лет, госпитализированных в ГБУЗ «ИКБ № 1 ДЗМ». Клинический диагноз устанавливался врачами-инфекционистами в соответствии с принятыми протоколами ведения больных. Обследование пациентов проведено с использованием двух методов: метода сравнения и метода LAMP. В качестве метода сравнения использовали коммерческий диагностический тест по выявлению специфических фрагментов генома *B. pertussis* методом ПЦР-РВ. Возраст пациентов распределился следующим образом: от 0 до 12 месяцев — 169 (64,5%) человек, от 1 года до 7 лет — 74 (28,2%) человек, от 7 до 18 лет — 12 (4,6%) человека, 18 лет и старше — 7 (2,7%) человек, то есть основную группу составили дети в возрасте от 0 до 12 месяцев (медиана 4 месяца). При использовании оптимизированного нами способа ДНК *B. pertussis* обнаружена у 252 (96,2%) больных.

Обследованные пациенты были с различными формами клинического течения коклюша — от стертой до тяжелой (табл. 1). У 43 (16,4%) больного коклюш протекал в легкой, у 194 (74%) — в среднетяжелой, у 24 (9,2%) — в тяжелой, у 1 (0,4%) — в стертой формах. Проведение исследования с помощью изотермической амплификации показало (табл. 1), что метод был эффективен при любых формах клинического течения коклюша. Так, ДНК *B. pertussis* обнаружена у всех пациентов с тяжелой формой коклюша (в 24 случаях из 24), в 95,8% случаев — у пациентов со среднетяжелой формой (у 186 из 194 больных) и в 95,3% случаев — у пациентов с легкой формой (у 41 из 43 больных) заболевания.

ДНК *B. pertussis* обнаружена в пробах клинического материала, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — на 1, 2, 3, 4, 5 и более неделях болезни: 13 (5,0%) человек — на 1-й, 73 (27,9%) — на 2-й, 98 (37,4%) — на 3-й, 53 (20,2%) — на 4-й, 25 (9,5%) — на 5-й и более неделях болезни (табл. 2). Из таблицы 2 видно, что ДНК возбудителя коклюша была выявлена в 92,3% случаев у пациентов на 1-й неделе (у 12 из 13 больных), в 98,6% случаев — на 2-й неделе (у 72 из 73 больных), в 97,9% случаев — на 3-й неделе (у 96 из 98 больных), в 90,6% случаев — на 4-й неделе (у 48 из 53 больных) и в 96% случаев — на 5-й и более неделях (у 24 из 25 больных) заболевания.

При изучении вакцинального статуса обследуемых было выявлено, что 221 (87,7%) больной

коклюшем не привит, 23 (9,1%) — привиты, а у 8 (3,2%) отсутствовали данные о вакцинации. У всех больных с помощью оптимизированного метода обнаружена ДНК *B. pertussis*.

Проведена оценка зависимости частоты выделения ДНК *B. pertussis* из клинического материала больных на фоне антибиотикотерапии (табл. 3). Обследуемые были разделены на 2 группы. I группу составили 172 (65,6%) пациента, которые в течение 30 дней до взятия материала не принимали антибактериальные препараты. Во II группу включено 90 (34,4%) больных, прошедших в течение 15 дней до или проходивших на момент взятия материала курс антибактериальной терапии. Из таблицы 3 видно, что у больных коклюшем как I, так и II группы ДНК *B. pertussis* обнаружена в высоком проценте случаев (96,7 и 95,9% соответственно). По результатам выполненного статистического анализа установлено, что выделение ДНК *B. pertussis* из клинического материала пациентов не зависит от приема антибактериальных препаратов (критерий χ^2 Пирсона, $p > 0,05$).

Так как дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш и у них наиболее высок риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти, то было важно оценить эффективность применения метода LAMP при обследовании этого контингента (табл. 4). В исследование включено 169 детей в возрасте от 0 до 12 месяцев, из которых 42% были дети от 0 до 3 месяцев, 36,1% — от 4 до 7 месяцев и 21,9% — от 8 до 12 месяцев. ДНК *B. pertussis* обнаружена в 98,6% случаев у детей больных коклюшем в возрасте от 0–3 месяцев (70 из 71 больного), в 98,4% случаев — у детей в возрасте 4–7 месяцев (у 60 из 61 больного) и в 94,6% случаев — у детей в возрасте 8–12 месяцев (у 35 из 37 больных). В целом эффективность обнаружения ДНК возбудителя у больных коклюшем с помощью оптимизированного метода LAMP составила 97,6%.

Обсуждение

За последние 40 лет достигнуты значительные успехи в совершенствовании методов идентификации патогенных микроорганизмов. На смену серологическим методам диагностики коклюша, позволяющим выявлять специфические антитела или поверхностные антигены, пришли методы определения генетических детерминант возбудителя [4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Разработка молекулярно-генетических технологий открыла новые перспективы и возможности ускоренной идентификации возбудителя, что будет способствовать быстрому выявлению больных и бактерионосителей, назначению своевременной терапии.

Таблица 1. Эффективность изотермической амплификации при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения коклюша

Table 1. Efficiency of isothermal amplification at inspection of patients with different of a clinical forms of whooping cough

Тяжесть течения заболевания Weight of a current of whooping cough	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс./abs.	%	абс./abs.	%	абс./abs.	%
Стертая форма/Erased form	1	0,4	1	0,4	–	–
Легкая форма/Easy form	43	16,4	41	15,6	2	0,8
Среднетяжелая форма/Medium form	194	74,0	186	71,0	8	3,0
Тяжелая форма/Severe form	24	9,2	24	9,2	–	–
Итого/Total	262	100	252	96,2	10	3,8

В настоящее время предложены разные ПЦР-технологии (nested-ПЦР, ПЦР-РВ), с помощью которых возможно проводить идентификацию различных участков генома *B. pertussis*: гена коклюшного токсина [6, 12, 14, 23, 30, 31], порина [19, 20], аденилатциклазного токсина [8], повторяющихся последовательностей хромосомы [2, 5, 11, 13, 33, 34]. Опыт применения ПЦР для идентификации возбудителей бордетеллез показал, что наиболее точные результаты получают при использовании праймеров, расположенных в промоторной зоне коклюшного токсина (Ptx), повторяющихся последовательностях IS481 и IS1001 или гене *суаА* [2, 18, 22, 27]. В США и Евросоюзе идентификация ДНК *B. pertussis* осуществляется в основном с помощью ПЦР или ПЦР в режиме реального времени, где мишенью является IS481 [8, 24]. Однако IS481 идентифицируется и в геномах других видов бордетелл, что может приводить к ложноположительным результатам [10]. Поэтому, учитывая разнообразие предложенных вариантов тест-систем, до сих пор нет международной унифицированной молекулярно-генетической тест-системы, существуют различия в выборе генов-мишеней для их детекции, трудности достоверной диф-

ференциации нескольких видов бордетелл, обусловленной высокой гомологией геномов, что в итоге препятствует стандартизации и созданию единой концепции диагностики коклюша с помощью амплификационных технологий.

Одной их перспективных технологий, развивающихся в направлении создания лабораторной диагностики «у постели больного» является петлеобразующая изотермическая амплификация (LAMP) [25, 26]. Данная технология впервые в 2006 году была предложена для выявления ДНК *B. pertussis* [16]. С 2015 г. в Японии выпускается коммерческая тест-система (Loopamp Bordetella pertussis detection kit), которая была использована для идентификации ДНК *B. pertussis* в клинических условиях [10]. Другими учеными [7] данная технология была оптимизирована в направлении флуоресцентной детекции с оценкой валидности на 213 клинических образцах по сравнению с ПЦР. Исследование показало, что диагностические чувствительность и специфичность LAMP составили 92,59 и 98,39%, что превышало результаты ранее проведенных исследований [16, 17]. При исключении отрицательных образцов, эти показатели увеличились до 96,55 и 99,46% соответственно [7]. В недавней работе японских ученых

Таблица 2. Эффективность изотермической амплификации при обследовании больных на различных сроках обследования

Table 2. Efficiency of isothermal amplification at inspection of patients on different period of disease

Период обследования Period of disease	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс./abs.	%	абс./abs.	%	абс./abs.	%
1-я неделя/1 week	13	5,0	12	4,6	1	0,4
2-я неделя/2 week	73	27,9	72	27,5	1	0,4
3-я неделя/3 week	98	37,4	96	36,6	2	0,8
4-я неделя/4 week	53	20,2	48	18,4	5	1,8
5-я неделя/5 week	25	9,5	24	9,1	1	0,4
Итого/Total	262	100	252	96,2	10	3,8

Таблица 3. Частота выявления ДНК *B. pertussis* у пациентов на фоне антибактериальной терапииTable 3. Frequency of identification of DNA *B. pertussis* at patients with antibacterial therapy

Группы пациентов Patients	Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP		Итого Total
	Положительный Positive	Отрицательный Negative	
I группа/I group	87	3	90
II группа/II group	165	8	172
Итого/Total	252	11	262

проведено сравнение эффективности выявления ДНК *B. pertussis* в LAMP, в которой праймеры фланкировали две разные мишени — области IS481 и Ptx промотор коклюшного токсина [15]. Исследования показали, что чувствительность составила 87,5 и 76,2%, и специфичность — 92,9 и 94,1% соответственно при индикации IS481 и Ptx. Кроме того, оптимизированный вариант LAMP, основанный на выявлении Ptx, позволяет идентифицировать *B. pertussis* с ptxP1, ptxP3 и ptxP8 аллелями промотора гена коклюшного токсина с высокой степенью аналитической чувствительности. Однако авторы констатируют необходимость совершенствования в направлении выявления *B. pertussis* с менее распространенными аллелями промотора, которые в представленном варианте будут идентифицироваться как ложноотрицательные [15].

Оценка диагностической эффективности оптимизированного нами способа ускоренной генодиагностики коклюша на основе этой технологии показала, что ДНК *B. pertussis* удалось обнаружить у 96,2% больных с любой формой клинического течения коклюша: у всех пациентов с тяжелой, в 95,8% случаев — со средне-тяжелой и в 95,3% случаев — с легкой формами заболевания. ДНК возбудителя коклюша обнаружена в 92,3–98,6% случаях в пробах, полученных от больных на разных сроках от начала заболевания — на 1, 2, 3, 4, 5-й неделях болезни, а также в высоком проценте случаев (96,7–95,9%) независимо от антибиотикотерапии и вакцинального статуса пациента.

Дети до 1 года являются основной возрастной группой, подлежащей госпитализации при подозрении на коклюш, у них наиболее высок риск развития осложнений и тяжелых форм клинического течения, приводящих к смерти. Кроме того, взятие клинического материала у детей раннего возраста представляет определенные трудности в связи с хаотичным вскармливанием (практически отсутствует интервал в 3–4 ч между кормлениями) и техникой забора, что приводит к потере биоматериала и снижению эффективности исследования. Поэтому представлялось важным оценить эффективность применения оптимизированного метода LAMP при обследовании этого контингента. Анализ показал, что эффективность обнаружения ДНК *B. pertussis* у этой категории больных составила 97,6%, причем у самой младшей возрастной категории (0–3 месяцев) удалось достичь 98,6% эффективности.

Полученные нами, также как и зарубежными коллегами [7, 10, 15, 16], результаты свидетельствуют о том, что применение LAMP технологии позволяет в короткие сроки выявить ДНК возбудителя коклюша и, тем самым, получить раннее лабораторное подтверждение диагноза «Коклюш» для назначения адекватной терапии. Кроме того, учитывая возможности использования интеркалирующей или флуоресцентной детекции, время проведения изотермической амплификации сокращается до 1 ч, по сравнению с ПЦР и ПЦР-РВ, а также не требует использования дорогостоящего и специализированного оборудования.

Таблица 4. Эффективность изотермической амплификации при обследовании детей в возрасте до 1 года, больных коклюшем

Table 4. Efficiency of isothermal amplification at inspection of children with whooping cough

Возрастная категория Age	Количество пациентов Number of patients		Результат выявления ДНК <i>B. pertussis</i> методом изотермической амплификации (LAMP) Identification of DNA <i>B. pertussis</i> by LAMP			
			Положительный Positive		Отрицательный Negative	
	абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%
0–3 месяцев/0–3 months	71	42,0	70	41,4	1	0,6
4–7 месяцев/4–7 months	61	36,1	60	35,5	1	0,6
8–12 месяцев/8–12 months	37	21,9	35	20,7	2	1,2
Итого/Total	169	100	165	97,6	4	2,4

Заключение

Оптимизированный диагностический тест по выявлению ДНК *B. pertussis* методом ЛАМР обладает 96,2% диагностической эффективностью

при обследовании больных с различной тяжестью клинического течения, на разных сроках от начала заболевания, независимо от вакцинального статуса, на фоне антибиотикотерапии, а также при обследовании детей в возрасте до 1 года.

Список литературы/References

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Mediko-biologicheskaya statistika [Primer of biostatistics]. Moscow: Practica, 1998. 459 p.]
2. Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Румянцева Ю.П., Воронина О.Л., Кунда М.С., Каратаев Г.И. Накопление авирулентных инсерционных Bvg мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2013. № 4. С. 22–26. [Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Romyantseva Yu.P., Voronina O.L., Kunda M.S., Karataev G.I. Accumulation of avirulent *Bordetella pertussis* Bvg mutants in the course of experimental whooping cough in mice. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2013, no. 4, pp. 22–26. (In Russ.)]
3. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2015. 216 с. [Petrie A., Sabin C. Naglyadnaya meditsinskaya statistika [Medical Statistics at a Glance]. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 216 p.]
4. Прадел М.Н., Яцышина С.Б., Селезнева Т.С., Малинина С.В., Бирюлева Н.В., Любимова Т.Е., Воробьева Н.С. ПЦР-диагностика инфекций, вызванных *B. pertussis*, *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 1. С. 53–56. [Praded M.N., Yatsyschyna S.B., Selezneva T.S., Malinina S.V., Birulyeva N.V., Lubimova T.Ye., Vorobyeva N.S. The kit of reagents for polymerase chain reaction diagnostic of infections caused by *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 1, pp. 53–56. (In Russ.)]
5. Backman A., Johansson B., Olcen P. Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, no. 10, pp. 2544–2548.
6. Birkebaek N.H., Heron I., Skjodt K. *Bordetella pertussis* diagnosed by polymerase chain reaction. *APMIS*, 1994, vol. 102, no. 4, pp. 291–294. doi: 10.1111/j.1699-0463.1994.tb04878.x
7. Brotons P., de Paz H.D., Esteva C., Latorre I., Muñoz-Almagro C. Validation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of pertussis infection in nasopharyngeal samples. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2016, vol. 16, no. 1, pp. 125–130. doi: 0.1586/14737159.2016.1112741
8. Douglas E., Coote J.G., Parton R., McPheat W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J. Med. Microbiol.*, 1993, vol. 38, no. 2, pp. 140–144. doi: 10.1099/00222615-38-2-140
9. Dragsted D.M., Dohn B., Madsen J., Jensen J.S. Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J. Med. Microbiol.*, 2004, vol. 53, no. 8, pp. 749–754. doi: 10.1099/jmm.0.45585-0
10. Fujino M., Suzuki E., Watanabe M., Nakayama T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) aids the clinical diagnosis of pertussis. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 68, no. 6, pp. 532–533. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.125
11. Glare E.M., Paton J.P., Premier R.R., Lawrence A.J., Nisbet I.T. Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 9, pp. 1982–1987.
12. Grimprel E.P., Begue P., Anjak I., Betsou F., Guiso N. Comparison of polymerase chain reaction, culture and Western immunoblot serology for diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 10, pp. 2745–2750.
13. He Q., Mertsola J., Soini H., Skurnik M., Ruuskanen O., Viljanen M.K. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 3, pp. 642–645.
14. Houard S., Hackel C., Herzog A., Bollen A. Specific identification of *Bordetella pertussis* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.*, 1989, vol. 140, no. 7, pp. 477–487.
15. Kamachi K., Moriuchi T., Hiramatsu Y., Otsuka N., Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Microbiol. Methods*, 2017, vol. 133, pp. 20–22. doi: 10.1016/j.mimet.2016.12.009
16. Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K., Soeung S.Ch., Sarath S., Nareth Y., Horiuchi Y., Kojima K., Takahashi M., Arakawa Y. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, no. 5, pp. 1899–1902. doi: 10.1128/JCM.44.5.1899-1902.2006
17. Kamachi K., Yoshino S., Katsukawa C., Otsuka N., Hiramatsu Y., Shibayama K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect.*, 2015, vol. 8, pp. 70–74. doi: 10.1016/j.nmni.2015.10.001
18. Lanotte Ph., Plouzeau C., Burucoa C., Grélaud C., Guillot S., Guiso N., Garnier F. Evaluation of four commercial real-time PCR assays for detection of *Bordetella* spp. in nasopharyngeal aspirates. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, no. 11, pp. 3943–3946. doi: 10.1128/JCM.00335-11
19. Li Z.M., Hannah J.H., Stibitz S., Nguyen N.Y., Manclark C.R., Brennan M.J. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.*, 1991, vol. 5, no. 7, pp. 1649–1656.
20. Li Z.M., Jansen D.L., Finn T.M., Halperin S.A., Kasina A., O'Connor S.P., Aoyama T., Manclark C.R., Brennan M.J. Identification of *Bordetella pertussis* infection by shared-primer PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, vol. 32, no. 3, pp. 783–789.
21. Litt D.J., Jauneikaite E., Tchipeva D., Harrison T.G., Fry N.K. Direct molecular typing of *Bordetella pertussis* from clinical specimens submitted for diagnostic quantitative (real-time) PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2012, vol. 61, no. 12, pp. 1662–1668. doi: 10.1099/jmm.0.049585-0
22. Loeffelholz M. Towards improved accuracy of *Bordetella pertussis* nucleic acid amplification tests. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 7, pp. 2186–2190. doi: 10.1128/JCM.00612-12

23. Mastrantonio P., Stefanelli P., Giuliano M. Polymerase chain reaction for the detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal aspirates. *J. Med. Microbiol.*, 1996, vol. 44, no. 4, pp. 261–266. doi: 10.1099/00222615-44-4-261
24. Mattoo S., Cherry J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 18, no. 2, pp. 326–382. doi: 10.1128/CMR.18.2.326-382.2005
25. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 1, pp. 1–5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9
26. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 12, pp. e63.
27. Qin X. Resurgence of pertussis and its laboratory diagnosis. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 2015, vol. 37, no. 9, pp. 69–76. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2015.04.001
28. Qin X., Galanakis E., Martin E.T., Englund J.A. Multitarget PCR for diagnosis of pertussis and its clinical implications. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 2, pp. 506–511. doi: 10.1128/JCM.02042-06
29. Rodgers L., Martin S.W., Cohn A., Budd J., Marcon M., Terranella A., Mandal S., Salamon D., Leber A., Tondella M.L., Tatti K., Spicer K., Emanuel A., Koch E., McGlone L., Pawloski L., Lemaile-Williams M., Tucker N., Iyer R., Clark T.A., Diorio M. Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* – Ohio, 2010–2011. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, vol. 56, no. 3, pp. 322–331. doi:10.1093/cid/cis888
30. Schlapfer G., Cherry J.D., Heininger U., Uberal M., Schmitt-Grohe S., Laussucq S., Just M., Stehr K. Polymerase chain reaction identification of *Bordetella pertussis* infections in vaccinees and family members in a pertussis vaccine efficacy trial in Germany. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1995, vol. 14, no. 3, pp. 209–214.
31. Schlapfer G., Senn H.P., Berger R., Just M. Use of the polymerase chain reaction to detect *Bordetella pertussis* in patients with mild or atypical symptoms of infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1993, vol. 12, no. 6, pp. 459–463.
32. Stone B.L., Daly J., Srivastava R. Duration of *Bordetella pertussis* polymerase chain reaction positivity in confirmed pertussis illness. *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.*, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 347–349. doi: 10.1093/jpids/piu004
33. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., Mooi F., Schellekens J. A clinical validation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* polymerase chain reaction: comparison with culture and serology using samples from patients with suspected whooping cough from a highly immunized population. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 174, no. 1, pp. 89–96.
34. Van der Zee A., Agterberg C., Peeters M., Schellekens J., Mooi F.R. Polymerase chain reaction assay for pertussis: simultaneous detection and discrimination of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, vol. 31, no. 8, pp. 2134–2140.

Авторы:

Пименова А.С., младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Борисова О.Ю., д.м.н., доцент, руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Петрова М.С., старший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Воронина И.С., младший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Борисова А.Б., младший научный сотрудник клинического отдела ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Шамшева О.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней у детей ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;
Афанасьев С.С., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Власов Е.В., зам. главного врача по медицинской части (детство) ГБУЗ Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия;
Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Authors:

Pimenova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Petrova M.S., PhD (Medicine), Senior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Voronina I.S., Junior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Borisova A.B., Junior Researcher, Clinical Department, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Shamsheva O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Infectious Diseases of Children, Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;
Afanasiev S.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head Researcher, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;
Vlasov E.V., Deputy Chief Physician For A Medical Part (Childhood) Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1 of the Moscow Department of Healthcare, Moscow, Russian Federation;
Aleshkin V.A., PhD, MD (Biology), Professor, Director of the G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.02.2018
 Отправлена на доработку 18.04.2018
 Принята к печати 16.07.2018

Received 06.02.2018
 Revision received 18.04.2018
 Accepted 16.07.2018

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА И АКТИВНОСТИ NAD(P)-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ НЕЙТРОФИЛОВ У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ СЕПСИСА

А.А. Савченко^{1,2}, А.Г. Борисов^{1,3}, Д.В. Черданцев³, О.В. Первова³,
И.В. Кудрявцев^{4,5}, И.И. Гвоздев¹, А.В. Мошев¹

¹ ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», обособленное подразделение «НИИ медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск, Россия

³ ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

⁴ ФГБНУ НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП). Обследовано 50 больных РГП внебольничного и госпитального происхождения в дооперационном периоде. С 5 по 10 сут послеоперационного периода у 35 больных (70%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей. Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови. По средней интенсивности флуоресценции оценивались уровни экспрессии поверхностных рецепторов. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биOLUMИнесцентного анализа. Установлено, что воспалительная реакция у больных РГП характеризуется нейтрофилезом и изменением фенотипа нейтрофилов в крови. Маркерами последующего развития сепсиса при РГП являются менее выраженное (по сравнению с показателями больных без осложнений) увеличение количества нейтрофилов, снижение содержания HLA-DR⁺-клеток на фоне высокого уровня нейтрофилов, экспрессирующих высокоаффинный рецептор для IgG. У пациентов без последующего развития осложнений повышается количество нейтрофилов с экспрессией рецептора CD23. Метаболизм нейтрофилов у больных РГП характеризуется снижением интенсивности пластических процессов за счет низкой активности

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., Гвоздев И.И., Мошев А.В. Особенности фенотипа и активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов у больных распространенным гнойным перитонитом в прогнозе развития сепсиса // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 369–376. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-369-376

Citation:

Savchenko A.A., Borisov A.G., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Kudryavtsev I.V., Gvozdev I.I., Moshev A.V. Features of the phenotype and NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in neutrophil by patients with widespread purulent peritonitis in prognosis for sepsis development // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 369–376. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-369-376

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и дисбалансом активности ферментов митохондриального компартмента. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции лактатдегидрогеназы и снижение активности NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу, что может повлиять на активность аэробного дыхания нейтрофилов. Установленные различия фенотипа и активности ферментов в нейтрофилах крови у больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса определяют возможность создания метода прогноза развития осложнений и разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде РГП.

Ключевые слова: перитонит, сепсис, нейтрофилы, функциональная активность, фенотип, метаболизм, дегидрогеназы.

FEATURES OF THE PHENOTYPE AND NAD(P)-DEPENDENT DEHYDROGENASES ACTIVITY IN NEUTROPHIL BY PATIENTS WITH WIDESPREAD PURULENT PERITONITIS IN PROGNOSIS FOR SEPSIS DEVELOPMENT

Savchenko A.A.^{a,b}, Borisov A.G.^{a,c}, Cherdancev D.V.^c, Pervova O.V.^c, Kudryavtsev I.V.^{d,e}, Gvozdev I.I.^a, Moshev A.V.^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 Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^c Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation

^d Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The aim of the study was to examine the features of phenotype and the levels of NAD(P)-dependent dehydrogenases activity of blood neutrophils in the prognosis of abdominal sepsis development in patients with widespread purulent peritonitis (WPP). 50 patients with WPP of community and hospital origin in the pre-operative period were examined. From the 5th to the 10th day of the postoperative period 35 patients (70%) had developed abdominal sepsis, 15 patients (30%) had absence of complications. As controls 67 respect healthy people were examined. The research blood neutrophils phenotype was performed by flow cytometry using a direct immunofluorescence whole peripheral blood. The levels of surface receptor expression was assessed by the mean fluorescence intensity. The NAD(P)-dependent dehydrogenases activity in the blood neutrophils studied using bioluminescence method. It was established that the inflammatory reaction in patients with WPP is characterized by neutrophilia and changes in the phenotype of blood neutrophils. The markers of the subsequent development of sepsis in WPP are less pronounced (in comparison with the indices of uncomplicated patients), an increase in the number of neutrophils, a decrease in the HLA-DR⁺-cell count against the background of a high level of neutrophils expressing a high affinity receptor for IgG. The patients without subsequent complications had the number of neutrophils with CD23 receptor expression is increased. Metabolism of neutrophils in patients with WPP is characterized by a decrease in the intensity of plastic processes due to low activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and an imbalance in the activity of the enzymes of the mitochondrial compartment. A feature of the neutrophil metabolism in patients with WPP without subsequent development of sepsis is a high activity of anaerobic lactate dehydrogenase reaction and a decrease in the activity of NADP-dependent decarboxylating malate dehydrogenase. The patients with WPP with subsequent development of sepsis had a high level of NAD-dependent outflow of substrates from the tricarboxylic acid cycle on the amino acid exchange reaction via glutamate dehydrogenase which can affect the activity of aerobic respiration of blood neutrophils. The established differences in the phenotype and activity of enzymes in the blood neutrophils in patients with WPP depending on the subsequent development of sepsis determine the possibility of creating a method for predicting the development of complications and developing immunoactive therapy in the postoperative period of WPP.

Key words: peritonitis, sepsis, neutrophils, functional activity, phenotype, metabolism, dehydrogenases.

Введение

Несмотря на достижения в медицине, летальность при распространенном гнойном перитоните (РГП), являющаяся главным критерием оценки эффективности применяемых способов лечения, удерживается на уровне 20–30%, а в случае генерализации инфекции и развития полиорганной недостаточности

и сепсиса достигает 75,8–100% [10, 14]. Само течение РГП, а также характер и особенности развития гнойных 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 [8].

Нейтрофильные гранулоциты являются высокореактивными клетками врожденного иммунитета. Они быстро мобилизуются в очаг воспаления, их функциональная активность, которая во многом зависит от уровня экспрессии различных рецепторов, определяет эффективность противомикробной защиты организма [7]. Учитывая, что все регуляторные и антигенные молекулы реализуют свое воздействие на клетку через рецепторы, влияя на экспрессию генов, модулируя энергетические и пластические реакции, функциональные проявления нейтрофилов не могут не иметь метаболической основы.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей фенотипа и уровней активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных РГП.

Материалы и методы

Обследовано 50 больных РГП (22 мужчины и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения в дооперационном периоде, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КГБУЗ «КМКБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $54,2 \pm 19,2$ года. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита и индексу брюшной полости. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [15]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции мы придерживались критериев ACCP/SCCM [6]. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-е сут госпитализации. С 5 по 10 сут послеоперационного периода у 35 больных (70%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа нейтрофильных гранулоцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с применением моноклональных антител (Beckman Coulter, США), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7): CD11b, CD62L, CD16, CD23, CD64 и HLA-DR. По средней интенсивности флуоресценции (MFI — Mean Fluorescence Intensity) оценивались уровни экспрессии по-

верхностных рецепторов. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [9]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США). В каждой пробе анализировали не менее 50 000 нейтрофилов.

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности фиколл-урографина. Исследование активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови проведено с помощью биолюминесцентного анализа [2]. Метаболизм нейтрофилов оценивали по активности следующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ), NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы (NADP-МДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции лактатдегидрогеназы (ЛДГ и NADH-ЛДГ), NAD- и NADH-зависимой реакции малатдегидрогеназы (МДГ и NADH-МДГ), NADP- и NADPH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-ГДГ и NADPH-ГДГ), NAD- и NADH-зависимой глутаматдегидрогеназы (NAD-ГДГ и NADH-ГДГ), NAD- и NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ (NAD-ИЦДГ и NADP-ИЦДГ соответственно) и глутатионредуктазы (ГР). Активность NAD(P)-зависимых дегидрогеназ выражали в ферментативных единицах на 10^4 клеток, где $1 \text{ E} = 1 \text{ мкмоль/мин}$ [3]. Исследование проводили на ферментативном препарате NAD(P):FMНоксидоредуктаз-люцифераза из *Photobacterium leiognathi* (получен в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск).

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

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. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты и обсуждение

Независимо от развития абдоминального сепсиса у больных РГП относительно контрольных значений существенно повышается количество нейтрофилов, абсолютное содержание CD62L⁺-клеток, а также процентный и абсолютный уровень CD64⁺-нейтрофилов в крови (табл. 1). Однако уровень нейтрофилов у больных с последующим развитием сепсиса ниже, чем в группе пациентов без развития осложнений. Количество CD64⁺-клеток при последующем сепсисе выше, чем у пациентов без последующего развития осложнений. Только у больных РГП без осложнений повышен абсолютный уровень

CD23⁺- и HLA-DR⁺-нейтрофилов. У пациентов с последующим развитием сепсиса в крови понижено процентное содержание HLA-DR⁺-клеток, как относительно контрольных значений, так и уровня выявленного у больных без последующего развития осложнений.

Средний уровень флуоресценции HLA-DR-рецептора на нейтрофилах крови у больных РГП без последующего развития осложнений ниже, чем у лиц контрольной группы и пациентов с последующим развитием сепсиса (см. табл. 1). Средний уровень флуоресценции CD64-маркера на нейтрофилах при РГП выше контрольных значений независимо от наличия/отсутствия последующих осложнений.

Таблица 1. Фенотип нейтрофильных гранулоцитов у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me, Q_{0,25}–Q_{0,75})

Table 1. The phenotype of neutrophilic granulocytes in patients with WPP in the forecast of sepsis development (Median values, Q_{0,25}–Q_{0,75})

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Без последующего развития сепсиса Without the subsequent development of sepsis n = 15		С последующим развитием сепсиса With the subsequent development of sepsis n = 35	
	Me	Q _{0,25} –Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} –Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} –Q _{0,75}
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л Neutrophils, 10 ⁹ /л	3,15	2,55–3,86	9,59	5,32–10,91	6,91	3,89–9,12
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,046	
CD62L ⁺ , %	5,5	2,6–7,5	5,4	3,8–8,2	6,3	4,2–7,7
CD62L ⁺ , 10 ⁹ /L	0,18	0,06–0,26	0,48	0,30–0,78	0,46	0,27–0,63
			p ₁ = 0,003		p ₁ < 0,001	
CD23 ⁺ , %	6,3	4,9–7,7	6,0	5,4–8,9	5,0	1,2–7,5
CD23 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,18	0,13–0,22	0,47	0,28–0,51	0,25	0,08–0,43
			p ₁ = 0,005			
HLA-DR ⁺ , %	98,2	94,2–99,2	97,7	96,4–99,0	69,7	37,8–94,3
					p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,012	
HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /L	2,69	2,01–3,40	7,24	4,95–9,39	3,62	1,47–6,19
			p ₁ < 0,001		p ₂ = 0,038	
CD64 ⁺ , %	15,8	5,5–42,1	54,5	20,7–72,5	84,9	30,7–99,9
			p ₁ = 0,009		p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,034	
CD64 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,50	0,14–3,03	1,25	0,62–4,12	2,19	0,81–8,43
			p ₁ = 0,012		p ₁ < 0,001 p ₂ = 0,040	
MFI HLA-DR ⁺ , o.e./relative units	1,66	1,52–1,85	1,32	1,21–1,39	1,62	1,33–1,95
			p ₁ = 0,008		p ₂ = 0,044	
MFI CD64 ⁺ , o.e./relative units	2,24	1,62–3,53	10,05	5,89–21,56	12,95	6,30–31,95
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	

Примечание: p₁ — статистически значимые различия с показателями контрольной группы; p₂ — статистически значимые различия с показателями больных РГП, у которых не будет сепсиса.

Note: p₁ — statistically significant differences with the parameters of the control group; p₂ — statistically significant differences with the rates of patients with WPP who will not have sepsis.

При исследовании активности NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови обнаружено, что независимо от развития абдоминального сепсиса при РГП относительно контрольных значений снижается активность Г6ФДГ, ЛДГ и NADP-ГДГ (табл. 2). Также независимо от последующего развития сепсиса у больных РГП в нейтрофилах повышается активность NADP-ИЦДГ, NADH-ЛДГ и NADH-МДГ. Однако у пациентов с после-

дующим развитием сепсиса внутриклеточная активность NADH-ЛДГ ниже, чем у пациентов без последующего развития сепсиса. У больных РГП без последующего развития сепсиса в нейтрофила понижена активность NADP-МДГ как относительного диапазона, так и выявленного у пациентов с последующим развитием сепсиса. У больных РГП с последующим развитием сепсиса в нейтрофилах повышена активность NADPH-ГДГ как относительно

Таблица 2. Активность NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназ в нейтрофилах крови у больных РГП в прогнозе развития сепсиса (Me, $Q_{0,25} - Q_{0,75}$)

Table 2. The activity of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases in blood neutrophils with WPP in the forecast of sepsis development (Median values, $Q_{0,25} - Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль Control n = 67		Без последующего развития сепсиса Without the subsequent development of sepsis n = 15		С последующим развитием сепсиса With the subsequent development of sepsis n = 35	
	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25} - Q_{0,75}$
Г6ФДГ Glu6PDH	0,86	0,12–4,16	0,01	0,005–0,30	0,04	0,01–0,58
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
ГЗФДГ Gly3PDH	0,54	0,07–1,68	0,38	0,08–1,03	0,61	0,30–1,35
ЛДГ LDH	11,45	1,44–43,03	0,01	0,005–1,12	0,01	0,001–0,17
			$p_1 < 0,001$		$p_1 < 0,001$	
NADP-МДГ NADP-MDH	0,02	0,01–0,77	0,007	0,005–0,01	0,02	0,01–0,14
			$p_1 = 0,024$		$p_2 = 0,008$	
NADP-ГДГ NADP-GluDH	0,12	0,05–0,83	0,02	0,01–0,04	0,02	0,01–0,05
			$p_1 = 0,019$		$p_1 = 0,004$	
NADP-ИЦДГ NADP-ICDH	1,18	0,18–2,79	5,39	0,55–10,13	7,95	2,16–16,22
			$p_1 = 0,039$		$p_1 = 0,002$	
МДГ MDH	4,01	0,85–10,31	4,48	0,74–13,10	8,51	0,96–18,61
NAD-ГДГ NAD-GluDH	0,53	0,12–1,42	0,46	0,13–1,08	0,42	0,18–1,36
NAD-ИЦДГ NAD-ICDH	0,05	0,01–1,85	3,40	0,01–7,64	4,92	1,57–6,79
			$p_1 = 0,009$		$p_1 < 0,001$	
NADH-ЛДГ NADH-LDH	0,24	0,10–10,23	18,32	2,15–70,01	3,98	1,05–23,40
			$p_1 = 0,010$		$p_1 = 0,025$ $p_2 = 0,018$	
NADH-МДГ NADH-MDH	12,60	2,05–53,34	73,87	35,22–127,13	47,41	12,16–96,33
			$p_1 < 0,001$		$p_1 = 0,037$	
ГР GR	1,02	0,27–3,30	1,15	0,31–2,98	1,04	0,19–2,45
NADH-ГДГ NADH-GluDH	5,31	1,02–16,39	8,20	2,52–21,03	25,78	8,78–53,67
					$p_1 = 0,012$ $p_2 = 0,044$	
NADPH-ГДГ NADPH-GluDH	45,29	7,13–88,71	30,85	11,20–39,59	30,35	8,78–62,48

Примечание: то же, что и для табл. 1.

Note: see Tabl. 1.

контрольного уровня, так и значений, выявленных у пациентов без последующего развития сепсиса.

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется увеличением содержания нейтрофилов в периферической крови. В то же время у больных с последующим развитием сепсиса количество нейтрофилов в крови ниже, чем у пациентов без осложнений. Можно предположить, что более слабый выход фагоцитирующих клеток является одной из причин развития осложнений РГП. Пропорционально повышению уровня нейтрофилов в крови у больных РГП повышается абсолютное количество клеток, экспрессирующих CD62L-маркер. Данная молекула относится к семейству L-селектинов, обеспечивает слабые межклеточные взаимодействия и принимает участие в экстравазации нейтрофилов [11]. Только у больных РГП без последующих осложнений в крови повышается абсолютное содержание CD23⁺- и HLA-DR⁺-нейтрофилов. Гликопротеин CD23 является низкоаффинным рецептором IgE, его экспрессия на нейтрофилах характеризует функциональную активацию клеток [12]. HLA-DR-рецептор (продукт главного комплекса гистосовместимости II класса) принимает участие в антигенпрезентации. Снижение уровня экспрессии HLA-DR-маркера на нейтрофилах больных РГП с отсутствием последующих осложнений, по-видимому, определяется миграцией активированных клеток в зону воспалительных процессов. В крови у больных РГП повышается количество CD64⁺-нейтрофилов и уровень экспрессии данного маркера, причем в группе пациентов с последующим развитием сепсиса содержание CD64⁺ более выражено, чем у больных с отсутствием осложнений. CD64 (высокоаффинный рецептор IgG) является маркером бактериальных инфекций. Более выраженное увеличение количества клеток, экспрессирующих CD64, у пациентов с последующим развитием сепсиса может являться показателем начинающейся бактериемии при РГП.

Исследуемые NAD- и NADP-зависимые дегидрогеназы нейтрофилов занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки, характеризуя основные обменные процессы. Так, Г6ФДГ является ключевым и инициализирующим ферментом пентозофосфатного цикла, от активности которого зависит широкий спектр синтетических процессов [2, 3]. Соответственно, снижение активности фермента в нейтрофилах больных РГП определяет значительную недостаточность реакций пластического обмена. NADP-МДГ также является NADP-зависимым ферментом, локализуемым в цитоплазматическом компартменте нейтрофилов. У больных РГП с последующим

развитием сепсиса активность фермента значительно снижена, тогда как у пациентов, у которых в процессе лечения развивается данной осложнение, активность NADP-МДГ соответствует контрольному уровню. Активность NADP-ГДГ, принимающего участие в процессах внутриклеточного обмена азота, при РГП снижается, активность NADP-ИЦДГ — повышается.

Так как пентозофосфатный цикл является конкурентом гликолизу за субстрат, можно предположить, что при снижении активности Г6ФДГ интенсивность субстратного потока по гликолизу возрастет. Действительно, у больных РГП в нейтрофилах активность анаэробной реакции ЛДГ (NADH-ЛДГ) повышается относительно контрольных значений, причем у пациентов без последующего развития сепсиса ее активность значительно выше, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса. Подобные изменения интенсивности анаэробного гликолиза, безусловно, повлияют на энергетическое состояние клеток. Следовательно, у больных РГП, послеоперационный период которых пройдет без осложнений, наработка АТФ в гликолизе более выражена, чем у пациентов с последующим развитием сепсиса. Причем известно, что изменение функциональной активности нейтрофилов происходит при повышении интенсивности субстратного потока по гликолизу [2, 5].

Нейтрофилы являются клетками, осуществляющими свою функцию преимущественно в анаэробных условиях. Однако их метаболизм также зависит от состояния обменных процессов в митохондриях [3]. Обнаружено, что активность NAD-ИЦДГ в нейтрофилах крови у больных РГП повышена независимо от наличия/отсутствия последующих осложнений. Фермент является лимитирующим интенсивность субстратного потока по циклу трикарбоновых кислот, который в значительной степени определяет активность аэробного дыхания [13]. Однако активность МДГ (другой фермент лимонного цикла) в нейтрофилах больных не изменена. Кроме того, у обследованных пациентов обнаружено повышение активности NADH-зависимой реакции МДГ, которая является ключевой в системе малат-аспартатного шунта митохондрий [3]. Подобный дисбаланс может значительно снизить энергетические возможности клеток и, безусловно, повлиять на их функциональную активность.

Цикл трикарбоновых кислот является анаплеротическим, соединяющим все основные метаболические процессы в клетке. В связи с этим можно предположить, что снижение интенсивности субстратного потока в промежутке между NAD-ИЦДГ и МДГ связана с выведением

ем субстратов лимонного цикла. Данная особенность зафиксирована в нейтрофилах у больных РГП с последующим развитием сепсиса. Обнаружено, что в клетках у лиц данной группы значительно повышается активность NADH-ГДГ, что отражает отток субстратов с лимонного цикла на реакции аминокислотного обмена.

Заключение

Воспалительная реакция у больных РГП характеризуется нейтрофилезом и изменением фенотипа нейтрофилов в крови. Установлено, что маркерами последующего развития сепсиса при РГП являются менее выраженное (по сравнению с показателями больных без осложнений) увеличение количества нейтрофилов, снижение содержания HLA-DR⁺ клеток на фоне высокого уровня нейтрофилов, экспрессирующих высокоаффинный рецептор для IgG. У пациентов без последующего развития осложнений повышается количество нейтрофилов с экспрессией рецептора CD23. Метаболизм нейтрофилов у больных РГП характеризуется снижением интенсивности пластических процессов

за счет низкой активности Г6ФДГ и дисбалансом активности ферментов митохондриального компартмента. Особенностью метаболизма нейтрофилов у больных РГП без последующего развития сепсиса является высокая активность анаэробной реакции ЛДГ и снижение активности NADP-МДГ. У больных РГП с последующим развитием сепсиса обнаружен высокий уровень NAD-зависимого оттока субстратов с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена через глутаматдегидрогеназу, что может повлиять на активность аэробного дыхания нейтрофилов. Установленные различия в состоянии фенотипа и активности ферментов в нейтрофилах у больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса определяют возможность создания метода прогноза развития осложнений и разработки иммуноактивной терапии в послеоперационном периоде РГП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Список литературы/References

1. 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.)]
2. Савченко А.А. Определение активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ в нейтрофильных гранулоцитах биолюминесцентным методом // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 5. С. 656–660. [Savchenko A.A. Evaluation of NAD(P)-dependent dehydrogenase activities in neutrophilic granulocytes by the bioluminescent method. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 159, no. 5, pp. 656–660. doi: 10.1007/s10517-015-3049-8 (In Russ.)]
3. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Н.: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitovetskii D.E., Borisov A.G. Immunometabolicheskie narusheniya pri rasprostranennom gnoynom peritonite [Immunometabolic disorders in common purulent peritonitis]. *Novosibirsk: Nauka*, 1996. 142 p.]
4. 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., Zdzitovetskii 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. (In Russ.)]
5. Behnen M., Möller S., Brozek A., Klingner M., Laskay T. Extracellular acidification inhibits the ROS-dependent formation of neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2017, vol. 8, 12 p. doi: 10.3389/fimmu.2017.00184
6. Bone R.S., Balk R.A.B., Cerra F.B. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, vol. 20, iss. 6, pp. 864–874.
7. Hyun Y.M., Hong C.W. Deep insight into neutrophil trafficking in various organs. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, vol. 102, iss. 3, pp. 617–629. doi: 10.1189/jlb.1RU1216-521R
8. Lastrucci C., Baillif V., Behar A., Al Saati T., Dubourdeau M., Maridonneau-Parini I., Cougoule C. Molecular and cellular profiles of the resolution phase in a damage-associated molecular pattern (DAMP)-mediated peritonitis model and revelation of leukocyte persistence in peritoneal tissues. *FASEB J.*, 2015, vol. 29, no. 5, pp. 1914–1929. doi: 10.1096/fj.14-259341
9. 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
10. 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 (Buchar)*, 2016, vol. 11, no. 4, pp. 277–285.
11. Spadaro M., Caldano M., Marnetto F., Lugaresi A., Bertolotto A. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4⁺ T cells. *J. Neuroinflammation*, 2015, vol. 12: 146, 9 p. doi: 10.1186/s12974-015-0365-x

12. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.*, 2015, vol. 268, iss. 1, pp. 222–235. doi: 10.1111/imr.12340
13. Upadhyay V.A., Brunner A.M., Fathi A.T. Isocitrate dehydrogenase (IDH) inhibition as treatment of myeloid malignancies: progress and future directions. *Pharmacol. Ther.*, 2017, vol. 177, pp. 123–128. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.003
14. 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
15. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, vol. 22, no. 7, pp. 707–710.

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;

Гвоздев И.И., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, обособленное подразделение НИИ медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия;

Мошев А.В., младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, ФГБНУ ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН, обособленное подразделение 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;

Gvozdev I.I., Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the RAS, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation;

Moshev A.V., Junior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Physiology and Pathology, Krasnoyarsk Science Center of the Siberian Branch of the RAS, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation.

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ssp. *BULGARICUS* НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА ФАГОЦИТОЗА

А.С. Долмашкина, Е.А. Горельникова, Л.В. Карпунина

Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, г. Саратов, Россия

Резюме. Изучено влияние *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* на активность макрофагов — перитонеальных (ПМФ) и альвеолярных (АМФ), выделенных из организма белых мышей на 1, 3, 5, 7 сут после введения лектина, в процессе фагоцитоза бактерий *Staphylococcus aureus* 209-Р. В ходе исследований было показано, что к 6 ч активность ПМФ и АМФ, выделенных через сутки после введения лектина увеличилась в 3,4 и 2,9 раза. ПМФ и АМФ, выделенные на 3 сутки из организма мышей, проявляли наибольшую активность через 6 ч инкубирования с бактериальными клетками в 1,6 и 2 раза в сравнении с контролем. На 5 сут ПМФ и АМФ проявляли наибольшую активность к 6 часам в процессе фагоцитоза в сравнении с контролем, соответственно, в 2,2 и 2,4 раза. На 7 сут только АМФ имели наибольшую активность через 30 мин инкубации с бактериями в 1,5 раза в сравнении с контролем в процессе фагоцитоза *in vitro* *S. aureus* 209-Р. В отношении ПМФ никаких изменений по сравнению с контролем не наблюдали. Анализ полученных данных показал, что активность макрофагов, выделенных из организма мышей, которым вводили лектин на 1, 3, 5 сут, существенно отличалась от контрольных значений на завершающих стадиях процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Можно предположить, что лектин, взаимодействуя с поверхностными структурами ПМФ и АМФ на 1, 3, 5 сут эксперимента, способствует более кратковременному процессу адгезии ими бактериальных клеток при фагоцитозе. Для оценки специфичности взаимодействия лектина с рецепторными структурами макрофагов были проведены эксперименты с белком, не обладающим лектиновыми свойствами — бычьим сывороточным альбумином — БСА, и с лектином, блокированным специфическими к нему углеводами. Было показано, что фагоцитарная активность макрофагов в присутствии БСА была аналогична контролю и существенно от него не отличалась. БСА не оказывал влияния на завершенность фагоцитоза бактерий макрофагами. При исследовании взаимодействия лектина, блокированного специфическими углеводами, на фагоцитарную активность макрофагов было отмечено некоторое повышение фагоцитарной активности в отношении ПМФ, через 6 ч процесса фагоцитоза и некоторое понижение после 0,5; 1 и 24 ч процесса фагоцитоза. В отношении АМФ лектин, блокированный смесью углеводов, был аналогичен контрольным значениям. Полученные результаты позволили говорить о специфичном связывании лектина *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с поверхностными рецепторами АМФ. Однако в отношении ПМФ наблюдалась небольшая активность макрофагов в процессе фагоцитоза, что говорит о специфичном и неспецифичном связывании лектина *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с поверхностными рецепторами ПМФ. Можно предположить, что на молекулярном уровне *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, помимо специфичного взаимодействия с рецепторными структурами ПМФ, может участвовать во множестве неспецифических реакций. Таким образом, лектин *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* увеличивал адге-

Адрес для переписки:

Долмашкина Алина Сергеевна
410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., 1,
Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова.
Тел.: 8 (986) 989-59-19.
E-mail: alina.dolmashkina@yandex.ru

Contacts:

Alina S. Dolmashkina
410012, Russian Federation, Saratov, Theater Square, 1,
Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov.
Phone: +7 (986) 989-59-19.
E-mail: alina.dolmashkina@yandex.ru

Библиографическое описание:

Долмашкина А.С., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Влияние лектина *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* на активность процесса фагоцитоза // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 377–382.
doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-377-382

Citation:

Dolmashkina A.S., Gorelnikova E.A., Karpunina L.V. Influence of the lectin *lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* on activity of the process of phagocytosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 377–382. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-377-382

живную способность макрофагов мышей, существенно влиял на завершенность процесса фагоцитоза бактериальных клеток. Обнаружено специфическое взаимодействие *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с поверхностными рецепторами АМФ, в отношении ПМФ наблюдали и специфическое, и неспецифическое взаимодействие.

Ключевые слова: лектин, фагоцитоз, бактерии, альвеолярные макрофаги, перитонеальные макрофаги, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

INFLUENCE OF THE LECTIN *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* ssp. *BULGARICUS* ON ACTIVITY OF THE PROCESS OF PHAGOCYTOSIS

Dolmashkina A.S., Gorelnikova E.A., Karpunina L.V.

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation

Abstract. The effect of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* on the activity of macrophages — peritoneal (PMP) and alveolar (AMP), isolated from the body of white mice at 1, 3, 5, 7 days after the introduction of lectin, in the process of phagocytosis of bacteria *Staphylococcus aureus* 209-P. In the course of the studies, it was shown that by 6 hours the activity of PMP and AMP isolated within 24 hours after lectin administration had increased by 3.4 and 2.9 times. The PMP and AMP, isolated from the mice for 3 days, showed the greatest activity after 6 hours of incubation with bacterial cells in 1.6 and 2 times in comparison with the control. On day 5, PMP and AMP showed the greatest activity by 6 hours in the process of phagocytosis compared with the control, respectively, in 2.2 and 2.4 times. At day 7, only AMP had the highest activity after 30 minutes of incubation with bacteria 1.5 times in comparison with the control in the process of phagocytosis in vitro by *S. aureus* 209-P. With respect to PMP, no changes were observed compared to the control. The analysis of the obtained data showed that the activity of macrophages isolated from the organism of mice injected with lectin on days 1, 3, 5 significantly differed from the control values at the final stages of the phagocytosis process of *S. aureus* 209-P. It can be assumed that the lectin interacting with the surface structures of PMP and AMP on the 1st, 3rd, 5th day of the experiment promotes a more short-term process of adhesion of bacterial cells in phagocytosis. To evaluate the specificity of lectin interaction with receptor structures of macrophages, experiments were conducted with a protein that did not have lectin properties-bovine serum albumin-BSA and lectin blocked by specific carbohydrates. It was shown that the phagocytic activity of macrophages in the presence of BSA was similar to control and did not differ significantly from it. BSA did not influence the completion of bacterial phagocytosis by macrophages. When studying the interaction of lectin blocked by specific carbohydrates on the phagocytic activity of macrophages, there was a slight increase in phagocytic activity against PMP, after 6 hours of phagocytosis and a slight decrease after 0.5 hours, 1 hour and 24 hours of phagocytosis. For AMP, the lectin blocked by a mixture of carbohydrates was similar to the control values. The results obtained made it possible to speak of the specific binding of lectin *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with surface AMP receptors. However, with respect to PMP, a small activity of macrophages in the process of phagocytosis was observed, which indicates the specific and non-specific binding of lectin *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with surface TMF receptors. It can be assumed that, at the molecular level, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, in addition to a specific interaction with the receptor structures of PMP, can participate in a variety of nonspecific reactions. Thus, the lectin *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* increased the adhesive ability of macrophages of mice, significantly influenced the completeness of the phagocytosis process of bacterial cells. A specific interaction of *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* with surface AMP receptors, both specific and non-specific interactions were observed with respect to PMP.

Key words: lectin, phagocytosis, bacteria, alveolar macrophages, peritoneal macrophages, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Введение

Изучение бактериальных лектинов является одним из интересных и перспективных направлений в современной микробиологии. Благодаря способности связывать специфические углеводы они находят широкое применение в диагностике различных инфекций [5]. К настоящему времени известно о том, что лектины могут взаимодействовать с перитонеальными макрофагами белых мышей [3], с рецепторами фагоцитов различного типа, изменяя активность фагоцитоза [1]. В отношении лектинов молочнокислых бактерий таких сведений не имеется. В связи с вышеизложенным, ис-

следование влияния лектинов молочнокислых бактерий на процесс фагоцитоза является весьма интересной и актуальной задачей.

Цель исследования — изучить влияние лектина *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* на процесс фагоцитоза бактерий *Staphylococcus aureus* 209-P.

Материалы и методы

В работе использовали лектин, ранее нами выделенный из *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* [4]. Культура *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* была получена из сухого порошка лиофилизированной бактериальной закваски болгарских

палочек, используемых в России для производства йогуртов (Государственное унитарное предприятие производственно-экспериментальный завод РАСН, Москва).

Лектин *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* не имеет цвета и запаха. Проявляет специфичность к D-глюкозе, L-фукозе, D-маннозе, D-целлобиозе. Лектин обладает антимикробной активностью в разной степени в отношении: *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* K2, *Xanthomonas campestris* 611, *Pseudomonas fluorescens* AP3.

В качестве доноров альвеолярных (АМФ) и перитонеальных (ПМФ) макрофагов использовали лабораторных белых мышей — самок, массой 19 г, возрастом 2–3 месяца. В ходе эксперимента было две группы: контрольная и опытная. Лектин *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* вводился мышам в концентрации 1,5 мкг/мл.

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с требованием Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург 18.03.1986 г.). Всех животных содержали в стандартных условиях вивария.

Для выделения альвеолярных и перитонеальных макрофагов животное умертвляли цервикальной дислокацией. Для получения ПМФ внутрибрюшинно вводили стерильным шприцем 5 мл среды 199. После экссудат забирали и переносили в центрифужные пробирки [7]. Для получения АМФ мышью вскрывали и удаляли легкие, после чего их переносили в стерильные чашки Петри со средой 199. Легкие измельчали ножницами, затем полученную взвесь собирали пипеткой и пропускали через нейлоновый фильтр в центрифужные пробирки.

Экссудат ПМФ и суспензию АМФ центрифугировали 15 минут при 600g. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, а центрифугат заливали средой 199 и переносили в стерильные пробирки с покровными стеклами.

Для моделирования процесса фагоцитоза *in vitro* оптимальной средой являлась среда 199, которая содержит дивалентные катионы и имеет рН 6,5–7,7.

Для моделирования процесса фагоцитоза использовали культуру *Staphylococcus aureus* 209-P, которая была получена из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского». Активность фагоцитоза определяли через 30 мин, 1, 6, 24 ч в течение 1, 3, 5, 7 сут. Микробные клетки добавляли во взвесь макрофагов в соот-

ношении 50:1 и инкубировали взвесь при 37°C. При исследовании фагоцитарной активности покровные стекла с адсорбированными на них макрофагами через 30 мин, 1, 6, 24 ч фиксировали спиртом и окрашивали по Романовскому–Гимзе. Контрольную пробу (без бактерий) инкубировали в течение 30 мин.

Учет результатов осуществляли микроскопически.

Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) определяли по формуле:

$$\text{ИЗФ} = \frac{\text{ФИ}_1 - \text{ФИ}_2}{\text{ФИ}_1},$$

где ФИ — фагоцитарный индекс, число макрофагов, захвативших бактерий; ФИ_1 — число активных макрофагов через 1 ч; ФИ_2 — число активных макрофагов через 24 ч после инкубации.

С помощью ИЗФ определяли завершенный или незавершенный фагоцитоз. Если $\text{ИЗФ} \geq 1$ — процесс фагоцитоза завершенный, если $0 < \text{ИЗФ} < 1$ — частичное переваривание микробных клеток, а если $\text{ИЗФ} < 0$ — то фагоцитарный процесс не завершен [2, 7].

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методикам с использованием t-критерия Стьюдента [6].

Результаты и обсуждение

Изучали влияние лектина *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* на активность макрофагов, выделенных из организма белых мышей на 1, 3, 5, 7 сут после введения лектина, в процессе фагоцитоза бактерий *S. aureus* 209-P.

В ходе исследований было показано, что к 6 часам активность ПМФ и АМФ, выделенных через сутки после введения лектина увеличилась в 3,4 и 2,9 раза. ПМФ и АМФ, выделенные на 3 сут из организма мышей, проявляли в 1,6 и 2 раза большую активность через 6 ч инкубирования с бактериальными клетками в сравнении с контролем.

На 5 сутки ПМФ и АМФ проявляли наибольшую активность к 6 часам в процессе фагоцитоза в сравнении с контролем, соответственно, в 2,2 и 2,4 раза.

На 7 сутки только альвеолярные макрофаги имели наибольшую активность через 30 мин инкубации с бактериями в 1,5 раза в сравнении с контролем в процессе фагоцитоза *in vitro* *S. aureus* 209-P. В отношении ПМФ никаких изменений по сравнению с контролем не наблюдали (табл. 1).

Следует отметить также, что для макрофагов, выделенных через 1, 3, 5 сут после введения мышам лектина, было характерным завершение процесса фагоцитоза к 24 часам, так как

Таблица 1. Влияние лектина *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* на число активных фагоцитирующих макрофагов мышей в процессе фагоцитозаTable 1. Effect of lectin *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* on the number of active phagocytic macrophages of mice in the process of phagocytosis

Время иммуногенеза Time immunogenesis	Макрофаги Macrophages	Количество активных макрофагов The number of active macrophages			
		0,5 ч 0,5 hour	1 ч 1 hour	6 ч 6 hour	24 ч 24 hour
Контроль (без лектина) Control (without lectin)	ПМФ PMP	7,0±0,3	9,0±0,5	8,0±2,0	15,0±0,2
	АМФ AMP	8,0±0,2	11,0±3,0	8,0±1,5	28,0±0,9
1 сутки 1 day	ПМФ PMP	6,0±1,5	4,0±2,0	27,0±2,0*	5,0±1,1*
	АМФ AMP	4,0±1,0*	7,0±1,5	23,0±1,0*	5,0±0,5*
3 сутки 3 day	ПМФ PMP	5,0±2,0	6,0±0,5*	13,0±0,5	8,0±1,5*
	АМФ AMP	6,0±1,5	7,0±1,0	16,0±1,0*	5,0±1,5*
5 сутки 5 day	ПМФ PMP	8,0±2,0	6,0±2,0	18,0±0,7	5,0±2,5
	АМФ AMP	7,0±0,5	6,0±1,5	19,0±0,6*	6,0±0,5*
7 сутки 7 day	ПМФ PMP	5,0±2,5	8,0±0,9	7,0±2,0	6,0±2,0*
	АМФ AMP	12,0±1,5*	10,0±0,5	11,0±1,0	10,0±0,8*

Примечание. P < 0,05* относительно контроля.

Note. P < 0.05* relative to the control.

Таблица 2. Индексы завершенности фагоцитоза *S. aureus* 209-Р макрофагами, полученными в разные сроки после введения мышам лектинаTable 2. Index of completeness of phagocytosis of *S. aureus* 209-Р by macrophages, obtained at different times after injection mice lectin

Время иммуногенеза Time of immunogenesis	ПМФ PMP	АМФ AMP
Контроль Control	-0,67±0,1	-1,5±0,14
1 сутки 1 day	-0,25±0,32*	0,3±0,19*
3 сутки 3 day	-0,33±0,37*	0,3±0,24
5 сутки 5 day	0,17±0,23*	0±0,16*
7 сутки 7 day	0,25±0,27*	0±0,31*

Примечание. P < 0,05* относительно контроля.

Note. P < 0.05* relative to the control.

в это время практически уменьшалось количество активных макрофагов аналогично контрольным показателям.

Анализ полученных данных показал, что активность макрофагов, выделенных из организма мышей, которым вводили лектин на 1, 3, 5 сут, существенно отличалась от контрольных значений на завершающих стадиях процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Можно предположить, что лектин, взаимодействуя с поверхностными структурами ПМФ и АМФ на 1, 3, 5 сут эксперимента способствует более кратковременному процессу адгезии ими бактериальных клеток при фагоцитозе.

На основе установленных фагоцитарных индексов были рассчитаны индексы завершенности фагоцитоза бактериальных клеток макрофагами интактных белых мышей.

Сравнение индексов завершенности фагоцитоза *S. aureus* 209-Р макрофагами, полученными в разные сроки после введения мышам лектина с ИЗФ макрофагов, выделенных из организма интактных животных, выявили

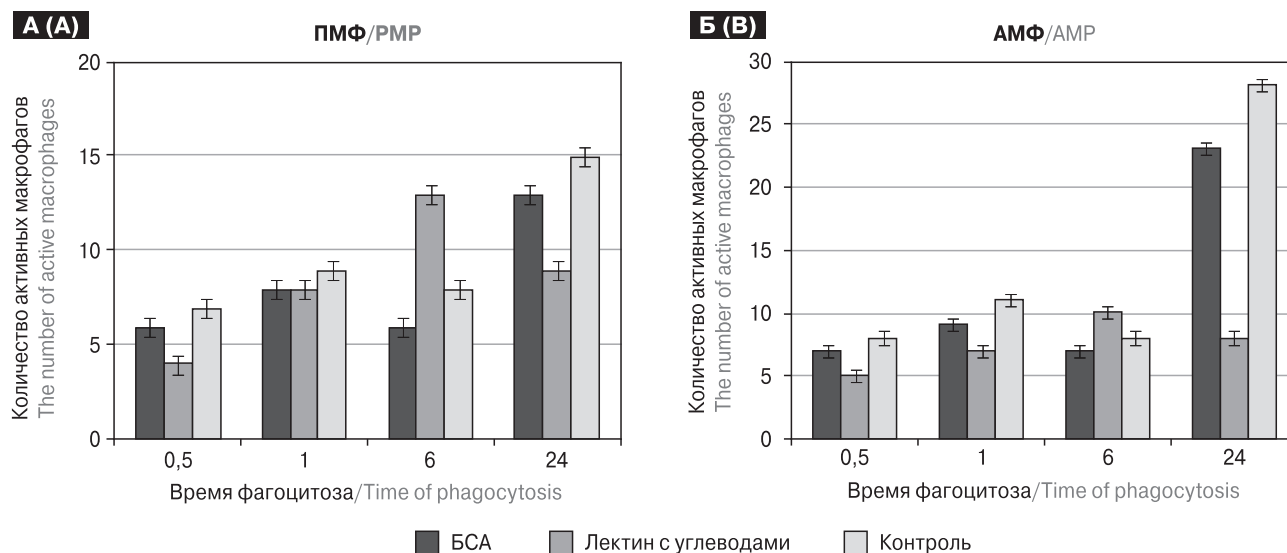


Рисунок. Фагоцитарная активность перитонеальных (А) и альвеолярных макрофагов (Б) под влиянием лектина, блокированного углеводами *in vitro*

Figure. Phagocytic activity of peritoneal (A) and alveolar macrophages (B) under the influence of the lectin blocked carbohydrates *in vitro*

различия завершенности фагоцитоза. Индекс завершенности фагоцитоза *S. aureus* 209-Р перитонеальных макрофагов и альвеолярных макрофагов из организма животных, после введения лектина значительно отличались от контрольных значений ($0 < \text{ИЗФ} < 1$) (табл. 2).

Таким образом, было показано, что введение лектина *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* белым мышам увеличивало адгезию макрофагами бактериальных клеток, но не оказывало существенного влияния на завершенность процесса фагоцитоза.

Для оценки специфичности взаимодействия лектина с рецепторными структурами макрофагов были проведены эксперименты с белком, не обладающим лектиновыми свойствами — бычьим сывороточным альбумином — БСА (Биолот, Россия), и с лектином, блокированным специфическими к нему углеводами.

БСА в концентрации 1,5 мкг/мл вносили по 100 мкл в пробирки с макрофагами перед внесением бактерий. Было показано, что фагоцитарная активность макрофагов (ПМФ и АМФ) в присутствии БСА была аналогична контролю и существенно от него не отличалась (рис.).

Лектин инкубировали со смесью углеводов, содержащей равные объемы D-глюкозы — 12,5 мкг/мл, L-фукозы — 12,5 мкг/мл, D-маннозы — 12,5 мкг/мл, D-целлобиозы — 12,5 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем лектин, блокированный углеводами, вносили в пробирки с макрофагами по 100 мкл, после чего добавляли бактериальную взвесь.

Исследования, проведенные с использованием лектина, блокированного смесью угле-

водов, показали, что в отношении ПМФ была заметна достоверная разница с контролем через час после начала процесса фагоцитоза. В отношении АМФ лектин, блокированный смесью углеводов, был аналогичен контрольным значениям.

При исследовании взаимодействия лектина блокированного специфическими углеводами на фагоцитарную активность макрофагов было отмечено некоторое повышение фагоцитарной активности в отношении ПМФ, через 6 ч процесса фагоцитоза и некоторое понижение после 0,5; 1 и 24 ч процесса фагоцитоза.

При воздействии БСА на макрофаги (ПМФ и АМФ) процесс фагоцитоза, как и в контроле, был незавершенным ($\text{ИЗФ} < 0$). ИЗФ макрофагов (ПМФ и АМФ) в присутствии смеси лектина с углеводами, имели положительные значения, но были меньше единицы, что являлось показателем частичного переваривания бактерий (рис.).

Полученные результаты позволяют судить о специфичном связывании лектина *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* с поверхностными рецепторами АМФ. Однако в отношении ПМФ наблюдалась небольшая активность макрофагов в процессе фагоцитоза, что говорит о специфичном и неспецифичном связывании лектина *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* с поверхностными рецепторами ПМФ. Можно предположить, что на молекулярном уровне *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, помимо специфичного взаимодействия с рецепторными структурами ПМФ, может участвовать во множестве неспецифических реакций.

Выводы

Показано, что лектин *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* увеличивал адгезивную способность макрофагов мышей, существенно влиял на завершенность

процесса фагоцитоза бактериальных клеток. Обнаружено специфическое взаимодействие *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* с поверхностными рецепторами АМФ, в отношении ПМФ наблюдали и специфическое, и неспецифическое взаимодействие.

Список литературы/References

1. Абросимова О.В., Горельникова Е.А., Тихомирова Е.И., Карпунина Л.В. Некоторые аспекты действия бактериального лектина на фагоцитирующие макрофаги мышей // Успехи современного естествознания. 2004. № 4. С. 97–98. [Abrosimova O.V., Gorelenkova E.A., Tikhomirova E.I., Karpunina L.V. Some aspects of the action of bacterial lectin on phagocytic macrophages of mice. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya = Successes of Modern Natural Science*, 2004, no. 4, pp. 97–98. (In Russ.)]
2. Васильева Г.И., Пустовалов В.Л., Дорошенко Е.П., Киселева А.К. Оценка вирулентности штаммов чумного микроба по индексу завершенности фагоцитоза // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 6. С. 117–118. [Vasilyeva G.I., Pustovalov V.L., Doroshenko E.P., Kiseleva A.K. Evaluation of virulence of strains of plague microbe in the index of completion of phagocytosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1987, no. 6, pp. 117–118. (In Russ.)]
3. Горельникова Е.А., Тихомирова Е.И., Карпунина Л.В. Действие лектина *Paenibacillus polymyxa* на цитокиновый статус животных // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. № 5. С. 82–85. [Gorelnikova E.A., Tikhomirova E.I., Karpunina L.V. Effect of *Paenibacillus polymyxa* lectin on cytokine status of animals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 5, pp. 82–85. (In Russ.)]
4. Долмашкина А.С., Балашова О.О., Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Выделение агглютинирующих белков с поверхности молочнокислых бактерий // Актуальная биотехнология. 2015. № 3 (14). С. 31. [Dolmashkina A.S., Balashova O.O., Goral'nikova E.A., Karpunina L.V. Isolation of agglutination proteins from the surface of lactic acid bacteria. *Aktual'naya biotekhnologiya = Actual Biotechnology*, 2015, no. 3 (14), p. 31. (In Russ.)]
5. Лахтин В.М. Специфичность лектинов микроорганизмов // Микробиология. 1992. Т. 28, № 4. С. 483–501. [Lakhtin V.M. Specificity of lectins of microorganisms. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 1992, vol. 28, no. 4, pp. 483–501. (In Russ.)]
6. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Журнал патологической физиологии и экспериментальной терапии. 1960. № 4. С. 84–105. [Oyvin I.A. Statistical processing of the results of experimental studies. *Zhurnal patologicheskoi fiziologii i eksperimental'noi terapii = Journal of Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 1960, no. 4, pp. 84–105. (In Russ.)]
7. Практикум по иммунологии. Под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. М.: МГУ, 2001. 224 с. [Praktikum po immunologii. Pod red. I.A. Kondrat'evoi, V.D. Samuilova. Moscow: Moscow State University, 2001. 224 p.]

Авторы:

Долмашкина А.С., аспирант, ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет, г. Саратов, Россия;
Горельникова Е.А., к.б.н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет, г. Саратов, Россия;
Карпунина Л.В., д.б.н., профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет, г. Саратов, Россия.

Authors:

Dolmashkina A.S., PhD Candidate, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation;
Gorelnikova E.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation;
Karpunina L.V., PhD, MD (Biology), Professor of the Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.01.2018
 Отправлена на доработку 28.04.2018
 Принята к печати 28.05.2018

Received 24.01.2018
 Revision received 28.04.2018
 Accepted 28.05.2018

IMPACT OF COINFECTION OF PV B19 ON THE COURSE AND PROGNOSIS OF MALARIA CAUSED BY *PLASMODIUM FALCIPARUM*

I.N. Lavrentyeva^a, I.V. Khamitova^a, A.V. Slita^a, A.E. Levkovski^b, A.A. Diallo^b, A.K. Diallo^b, T.C. Sow^b, E.V. Naydenova^c, D.A. Agafonov^c, A.M. Senichkina^c

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

^b Hospital RUSAL FRIGUIA, Fria, Republic of Guinea

^c Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Parvovirus infection (PVI) is widespread in the world; more than 80% of the adult population have antibodies of IgG class to parvovirus B19. Malaria is a vector-borne parasitic disease caused by the protozoa of the genus *Plasmodium*, that is widespread in the countries of Africa, Southeast Asia, Oceania. The objective of the present study was to evaluate the effect of parvovirus B19 infection on the clinical course of malaria and the outcome of the underlying disease. During the period 2016–2018 blood plasma samples of 316 patients from the hospital of the Fria Prefecture of the Republic of Guinea (GR) with confirmed diagnosis of malaria were examined for the presence of PVB19 DNA. The clinical course of malaria in 316 examined patients was divided into group of either mild or complicated. In total, PVB19 DNA was detected in blood plasma in 55 of 316 patients (17.41±2.13%). But in the group with co-infection of PVB19 and *P. falciparum* complications were observed in 40 of 55 (72.73±2.75%) patients, and in 6 of 55 cases (10.91±4.40%) the disease resulted in death. In the group of patients with malaria without PVI, complications occurred in 99 of 261 patients (37.9±3.0%); of those 2 (0.77±0.54%) died. It was found that the most numerous group in the structure of malaria patients is represented by children under 5 (median 3) years (89, or 28.25±2.53%). Our results correlate with the data of other researchers who studied the PVI-associated malaria in children in malaria-endemic regions: among children under 5 years, the absolute majority of cases of PVI was accompanied by a complicated course of malaria. The primary parvovirus infection can aggravate the course of malaria, especially when combined with other unfavorable conditions (iron deficiency, malnutrition, helminthic infections, co-infections, etc.). Thus, infection with PVB19 becomes a critical factor, which can provoke a severe life-threatening anemia, and also cause other complications.

Key words: parvovirus infection, DNA of parvovirus B19, *Plasmodium falciparum*, malaria, anemia.

ВЛИЯНИЕ КОИНФИЦИРОВАНИЯ PVB19 И *PLASMODIUM FALCIPARUM* НА ТЕЧЕНИЕ И ПРОГНОЗ МАЛЯРИИ

Лаврентьева И.Н.¹, Хамитова И.В.¹, Слита А.В.¹, Левковский А.Е.², Диало А.А.², Диало А.К.², Соу Т.С.², Найденнова Е.В.³, Агафонов Д.А.³, Сеничкина А.М.³

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

² Госпиталь «РУСАЛ» Боксито-глиноземного комплекса «Фригия», г. Фрия, Гвинейская Республика

³ ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия

Резюме. Парвовирусная инфекция (ПВИ) широко распространена в мире: более 80% взрослого населения имеют антитела класса G к парвовирусу B19. Малярия — трансмиссивное паразитарное заболевание, вызываемое

Адрес для переписки:

Лаврентьева Ирина Николаевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИЭМ имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-11 (служебн.); 8 (921) 341-05-01 (моб.).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Contacts:

Irina N. Lavrentieva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-11 (office); +7 (921) 341-05-01 (mobile).
E-mail: pasteur.lawr@mail.ru

Библиографическое описание:

Лаврентьева И.Н., Хамитова И.В., Слита А.В., Левковский А.Е., Диало А.А., Диало А.К., Соу Т.С., Найденнова Е.В., Агафонов Д.А., Сеничкина А.М. Влияние коинфицирования PVB19 и *Plasmodium falciparum* на течение и прогноз малярии // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 383–387. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-383-387

Citation:

Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K., Sow T.C., Naydenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M. Impact of coinfection of PV B19 on the course and prognosis of malaria caused by *Plasmodium falciparum* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 383–387. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-383-387

простейшим рода *Plasmodium*, широко распространенное в странах Африки, Юго-Восточной Азии, Океании. Целью работы было изучение влияния инфицирования парвовирусом В19 на клиническое течение малярии и исход основного заболевания. В период 2016–2018 гг. на наличие ДНК PVB19 исследованы образцы плазмы крови больных госпиталя префектуры Фрия Гвинейской Республики (ГР) с лабораторно подтвержденным диагнозом «малярия». Клиническое течение малярии у 316 обследованных пациентов оценивали как «простое» и «осложненное». В целом, ДНК PVB19 DNA была выявлена в плазме крови 55 из 316 пациентов ($17,41 \pm 2,13\%$). Но в группе больных с коинфицированием PVB19 и *P. falciparum* осложненное течение малярии наблюдали у 40 из 55 ($72,73 \pm 2,75\%$) пациентов, и в 6 из 55 случаев ($10,91 \pm 4,40\%$) регистрировали летальный исход. В группе пациентов с малярией без коинфицирования парвовирусом В19 осложнения наблюдались у 99 из 261 пациента ($37,9 \pm 3,0\%$); из них 2 ($0,77 \pm 0,54\%$) умерли. Было обнаружено, что наиболее многочисленная группа в структуре больных малярией представлена детьми в возрасте до 5 лет (средний 3 года) (89, или $28,25 \pm 2,53\%$). Наши результаты коррелируют с данными других исследователей: среди детей в возрасте до 5 лет, проживающих в районах, эндемичных по малярии, абсолютное большинство случаев парвовирусной инфекции сопровождалось осложненным течением малярии. Парвовирусная инфекция, развивающаяся в раннем детском возрасте, может усугублять течение малярии, особенно на фоне других неблагоприятных условий (дефицит железа, недоедание, гельминтные инвазии, коинфекции и пр.). При этом инфицирование PVB19 становится критическим фактором, который может провоцировать злокачественное течение анемии с угрозой для жизни, а также вызывать другие осложнения.

Ключевые слова: парвовирусная инфекция, ДНК парвовируса В19, *Plasmodium falciparum*, малярия, анемия.

Introduction

Parvovirus infection (PVI) is widespread in the world; more than 80% of the adult population have antibodies of IgG class to parvovirus B19 [6]. The causative agent of PVI is the DNA-containing parvovirus B19 (PVB19). PVB19 has a tropism for cells carrying P-antigen (Gb4 receptor). These are the precursor cells of the erythroid bone marrow lineage, liver, spleen, heart and intestine tissues, mature erythrocytes, granulocytes, endothelial and smooth muscle cells of the vessels. Depending on the hematological and immunological status, the manifestations of PVI vary from asymptomatic course or mild exanthemic disease (infectious erythema) to severe forms (aplastic crisis, pancytopenia, acute hepatitis, fulminant hepatic failure, encephalitis, cardiomyopathy and myocarditis). Parvovirus infection complicates the course of diseases accompanied by immunodeficiencies (oncological, hematological, etc.) [1, 2, 9]. According to several authors, infection with PVB19 can aggravate the course of malaria [3, 8, 12, 14].

Malaria is a vector-borne parasitic disease caused by the protozoa of the genus *Plasmodium*, that is widespread in the countries of Equatorial Africa, Southeast Asia, Oceania, Central and South America. The problem of malaria is especially urgent for the Sub-Saharan Africa. This territory accounts for 90% of cases and 92% of deaths from malaria in the world. According to WHO, in the Republic of Guinea (GR) in 2015, 811 000 cases of laboratory-confirmed malaria were detected. The disease proceeds with cyclic fever, febrile paroxysms, hepatorenal and anemic syndrome. Severe complications of malaria leading to death can be cerebral edema, cerebral (malarial) coma, splenic and kidney failure,

disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC-syndrome), acute massive hemolysis, hemoglobinuria, hemorrhagic syndrome.

The objective of the present study was to evaluate the effect of parvovirus B19 infection on the clinical course of malaria and the outcome of the underlying disease.

Materials and methods

During the period 2016–2018 blood plasma samples of 316 patients from the hospital of the Fria Prefecture of the Republic of Guinea (GR) with confirmed diagnosis of malaria were examined for the presence of PVB19 DNA. DNA PVB19 was detected by PCR using the sets of reagents Ampliprime “RIBO-prep” and “AmpliSens® Parvovirus B19-FL” (Central Institution of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Russia) in accordance with the manufacturer’s instruction.

Statistical treatment of the results was carried out using the analysis of frequency distributions and conjugacy tables using the GraphPadInStat 3 software. The significance of the differences and the confidence interval were determined by the Student’s t-test. Differences were considered significant at $p < 0.01$.

Results

The clinical course of malaria in 316 examined patients was divided into group of either mild or complicated. A mild course of malaria was detected in 177 ($56.01 \pm 2.79\%$) patients. This form of the disease was characterized by fever with temperature not exceeding 39°C , general weakness and moderate anemia (hemoglobin concentration higher than

Table 1. The effect of parvovirus B19 infecting on the course of malaria in patients of Fria Prefecture of the Republic of Guinea

Course of malaria	Number of patients, abs./%	Presence of PV19 DNA	
		Positive, abs./%	Negative, abs./%
Mild	177/56.01±2.79	15/27.27±2.75	162/62.07±3.0
Complicated	139/43.99±2.79	40/72.73±2.75	99/37.93±3.0
Lethal outcome	8/2.53±0.88	6/10.91±4.40	2/0.77±0.54
Total	316/100	55/17.41±2.13	261/82.6±2.13

70 g/l). 139 patients (43.99±2.79%) manifested the complicated course of malaria that was accompanied by a rise of the temperature up to 40°C, nausea, vomiting, severe anemia (hemoglobin concentration lower than 70 g/l), high levels of transaminases, creatinine, a decrease in the total protein in the blood. In 8 (2.53±0.88%) cases, the severe course of the disease led to a fatal outcome.

Plasma samples of patients with mild and complicated forms of malaria were tested for the presence of PVB19 DNA. The results are shown in Table 1.

In total, PVB19 DNA was detected in blood plasma in 55 of 316 patients (17.41±2.13%). In groups of both PVB19-positive and negative patients, cases of mild and complicated as well as fatal outcomes were detected. However, in the group with co-infection of PVB19 and *P. falciparum*, complications and mortality rates were significantly higher. Indeed, complications were observed in 40 of 55 (72.73±2.75%) patients, and in 6 of 55 cases (10.91±4.40%) the disease resulted in death. In the group of patients with malaria without PVI, complications occurred in 99 of 261 patients (37.9±3.0%); of those 2 (0.77±0.54%) died. Thus, the probability of developing a complicated course of malaria with a co-infection is significantly higher than in the absence of PVI ($p < 0.0001$; RR = 1.917; 95% CI: 1.532 to 2.399).

To study the age structure of patients with malaria, they were distributed into seven age groups: 0–5, 6–10, 11–15, 16–25, 26–45 and 46–65 years old (Table 2). It was found that the most numerous group in the structure of malaria patients is represented by children under 5 (median 3) years (89, or 28.25±2.53%). The lowest number of malaria cases falls into the age group of 46–65 (median 57) years — 17 cases, or 5.4±0.71%. It is noteworthy that the DNA of PVB19 in the blood plasma of patients of this group has not been detected.

In other age groups of patients with malaria, the presence of PVB19 DNA in the blood plasma is characterized by the following rates: among children under 5 years (median 3 years) it was detected in 17.98±4.07% of patients; in the group of 6–10 years (median 8 years), the detection rate increased to 28.85±6.28, and reached a maximum of 34.29±8.02% in the group of 11–15 years (median 13 years). These results indicate a wide prevalence of parvovirus infection among children and adoles-

cents and correspond to the data available in the literature [5, 13, 15]. In older patients, this value was reduced to 15.38±5.0% in the group of 16–25 years (median 20 years), to 5.71±3.22% in the group of 26–45 years (median 36.5 years) and zero in the age group of 46–65 years (median 57 years). The severity of PVB19-associated malaria was analyzed in different age groups. The results are summarized in Table 3.

As can be seen from the results presented, the maximum number of cases of complicated malaria with PVI ($n = 15$) was observed in patients under 5 years old, where it accounts for 93.75±6.05% of cases comparing to 27.27±7.04% among all PVB19-positive patients. The likelihood of developing a complicated course of malaria with a co-infection in this age group is significantly higher than in the absence of PVI ($p = 0.0001$; RR = 2.44; 95% CI: 1.780–3.357). It is important to note that 6 out of 8 deaths occur in this group, that is significantly higher than in the absence of infection with PV B19 ($p = 0.0003$, RR = 13.688, 95% CI: 3.034–61.740). With age increase, the incidence of complicated course of PVI-combined malaria decreases, although the trend persists in individuals under 26 years of age. Thus, among patients of 6–10 years of age, complicated malaria was recorded in 18.18±5.75% of PV B19-infected persons; in the group of 11–15 years — in 14.55±5.14% of cases; in persons from 16 to 25 years in 9.09±4.07% of cases. However, the differences in the course of malaria between patients infected and not infected with parvovirus B19 are not statistically reliable in all these age groups.

Table 2. Age distribution of malaria patients with combined parvoviral infection

Age group, years	Number of patients, abs./%	PVB19-positive, abs./%
0–5	89/28.25±2.53	16/17.98±4.07
6–10	52/16.51±2.09	15/28.85±6.28
11–15	35/11.11±1.77	12/34.29±8.02
16–25	52/16.51±2.09	8/15.38±5.00
26–45	70/22.22±1.16	4/5.71±3.22
46–65	17/5.40±0.71	0/0.0
Total	315/100	55/17.46±2.14

Table 3. Mild and complicated course of malaria associated with parvovirus B19 infection in different age groups

Age, years	Mild disease, abs./%	Complicated disease, abs./%
0–5	1/1.82±1.80	15/27.27±7.04
6–10	5/9.09±3.88	10/18.18±5.75
11–15	4/7.27±3.50	8/14.55±5.14
16–25	3/5.45±3.06	5/9.09±4.07
26–45	2/3.64±2.52	2/3.64±2.57
46–65	0/0.0%	0/0.0%
Total (n = 55)	15/27.27±6.01%	40/72.73±11.50%

Discussion

It is known that in seronegative individuals with primary infection parvovirus in the acute phase can cause a failure of erythrocytes formation for up to 5–7 days, which leads to a significant decrease in hemoglobin [15]. Erythrocytes are also the main target of the malarial plasmodium, which multiplies within and destroys them thus causing anemia of varying severity. According to several authors, infection with PVI occurs after decrease in cellular immunity caused by *P. falciparum* [4, 7]. There is evidence that in severe malaria-endemic regions severe forms of anemia are the main cause of child mortality.

Thus, severe anemia is considered the cause of childhood death in malaria in 17–54% of cases [11, 13].

Our results correlate with the data of other researchers who studied the PVI-associated malaria in children in malaria-endemic regions: among children under 5 years, the absolute majority of cases of PVI was accompanied by a complicated course of malaria [4, 10, 14].

Having in mind that according to studies, in African countries 50 to 90% of the population by age 6 have IgG antibodies to PVB19 [15] and, based on the results obtained, it can be assumed that the probability of complicated course of PVI-associated malaria depends on the age of the patient. The older the patient, the higher the probability of having immunity to parvovirus, and, therefore, the less influence the associated infection demonstrates.

In contrast, the primary parvovirus infection, which normally occurs in early childhood, is acute and can aggravate the course of malaria, especially when combined with other unfavorable conditions (iron deficiency, malnutrition, helminthic infections, co-infections, etc.). Thus, infection with PVB19 becomes a critical factor, which can provoke a severe life-threatening anemia, and also cause other complications.

In general, the results of this study indicate a high medical-social significance of parvovirus infection for countries endemic for malaria.

Список литературы/References

1. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю. Парвовирус В19 человека — характеристика возбудителя и распространение обусловленной им инфекции // Инфекция и иммунитет. 2013. Т. 3, № 4. С. 311–322. [Lavrentyeva I.N., Antipova A.Yu. Human parvovirus B19: virus characteristics, distribution and diagnostics. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, vol. 3, no. 4, pp. 311–322. doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-311-322 (In Russ.)]
2. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Бичурин М.А., Семенов А.В. Генотипирование изолятов парвовируса В19, циркулирующих в Северо-Западном федеральном округе России // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2013. № 6. С. 36–43. [Lavrentyeva I.N., Antipova A.Yu., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Bichurina M.A. Parvovirus B19 stains genotyping as exanthematous diseases epidemiological surveillance improvement in Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 36–43. (In Russ.)]
3. Agarwal R., Baid R., Datta R., Saha M., Sarkar N. Falciparum malaria and parvovirus B19 coinfection: a rare entity. *Trop. Parasitol.*, 2017, vol. 7 (1), pp. 47–48. doi: 10.4103/2229-5070.202299
4. Duedu K.O., Sagoe K.W., Ayeh-Kumi P.F., Afrim R.B., Adiku T., Huat L.B. The effects of co-infection with human parvovirus B19 and Plasmodium falciparum on type and degree of anaemia in Ghanaian children. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 129–139. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60037-4
5. Florea A.V., Ionescu D.N., Melhem M.F. Parvovirus B19 infection in the Immunocompromised host. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2007, vol. 131, pp. 799–804. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[799:PBIITI]2.0.CO;2
6. Heegaard E.D., Brown K.E. Human parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 15, pp. 485–505. doi: 10.1128/CMR.15.3.485-505.2002
7. Ho M., Webster H.K., Looareesuwan S., Supanaranond W., Phillips R.E., Chanthavanich P., Warrell D.A. Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to Plasmodium falciparum. *J. Infect. Dis.*, 1986, vol. 153, pp. 763–771.
8. Ingrassia F., Gadaleta A., Maggi P., Pastore G. Plasmodium falciparum malaria and Parvovirus B19; a case of acute co-infection. *BMC Infect. Dis.*, 2010, vol. 10, p. 87. doi: 10.1186/1471-2334-10-87
9. Jitschin R., Peters O., Plentz A., Turowski P., Segerer H., Modrow S. Impact of parvovirus B19 infection on paediatric patients with haematological and/or oncological disorders. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2011, vol. 17, no. 9, pp. 1336–1342. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03355.x
10. Manning L., Laman M., Rosanas-Urgell A., Michon P., Aipit S., Bona C., Siba P., Mueller I., Davis T.M. Severe anemia in Papua New Guinean children from a malaria-endemic area: a case-control etiologic study. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2012, vol. 6, no. 12: e1972. doi: 10.1371/journal.pntd.0001972

11. Newton C.R., Warn P.A., Winstanley P.A., Peshu N., Snow R.W., Pasvol G., Marsh K. Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya. *Trop. Medicine & International Health*, 1997, vol. 2, no. 2, pp. 165–178. doi: 10.1046/j.1365-3156.1997.d01-238.x
12. Scarlata F., Gianelli E., Miceli S., Galimberti L., Antinori S. Acute parvovirus B19 infection and anemia during *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Infect. Dis.*, 2002, vol. 35, no. 11, pp. 1449–1451. doi: 10.1086/344452
13. Slutsker L., Taylor T.E., Wirima J.J., Steketee R.W. In-hospital morbidity and mortality due to malaria-associated severe anaemia in two areas of Malawi with different patterns of malaria infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 88, 548–551.
14. Toan N.L., Sy B.T., Song L. H., Luong H. V., Binh N. T., Binh, Vu Q., Kandolf R., Velavan T.P., Kremsner P.G., Bock C.-T. Co-infection of human parvovirus B19 with *Plasmodium falciparum* contributes to malaria disease severity in Gabonese patients. *BMC Infect. Dis.*, 2013, vol. 13: 375. doi: 10.1186/1471-2334-13-375
15. Wildig J., Cossart Y., Peshu N., Gicheru N., Tuju J., Williams T.N., Newton C.R. Parvovirus B19 infection and severe anaemia in Kenyan children: a retrospective case control study / *BMC Infect. Dis.*, 2010, vol. 10: 88. doi:10.1186/1471-2334-10-88
16. Wildig J., Michon P., Siba P., Mellombo M., Ura A., Mueller I., Cossart Y. Parvovirus B19 infection contributes to severe anemia in young children in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.*, 2006, vol. 194, no. 2, pp. 146–153. doi: 10.1086/505082

Авторы:

Лаврентьева И.Н., д.м.н., зав. лабораторией экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Хамитова И.В., зав. Центральной клинико-диагностической лабораторией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Слита А.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Левковский А.Е., руководитель госпиталя «Русал» боксито-глиноземного комплекса «Фригия», г. Фрия, Гвинейская Республика;
Диало А.А., главный врач госпиталя Русал БГК «Фригия», г. Фрия, Гвинейская Республика;
Диало А.К., зав. лабораторией госпиталя Русал БГК «Фригия», г. Фрия, Гвинейская Республика;
Соу Т.С., врач-лаборант госпиталя Русал БГК «Фригия», г. Фрия, Гвинейская Республика;
Найденова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Агафонов Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Сеничкина А.М., к.б.н., научный сотрудник отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Lavrentyeva I.N., PhD, MD (Medicine), Head of Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Khamitova I.V., Head of Central Clinical Diagnostic Laboratory, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Slita A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Virology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Levkovski A.E., Head of the Hospital RUSAL FRIGUIA, Fria, Republic of Guinea;
Diallo A.A., Head Physician, Hospital RUSAL FRIGUIA, Fria, Republic of Guinea;
Diallo A.K., Head of the Laboratory, Hospital RUSAL FRIGUIA, Fria, Republic of Guinea;
Sow T.C., Laboratory assistant Hospital RUSAL FRIGUIA, Fria, Republic of Guinea
Naydenova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Diagnostics of Infectious Diseases, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Agafonov D.A., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Microbiology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Senichkina A.M., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Diagnostics of Infectious Diseases, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СООТВЕТСТВИЯ ПРОТОТИПА РЕКОМБИНАНТНОЙ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ВАКЦИНЫ ТРЕБОВАНИЯМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Н.И. Микшис, А.П. Семакова, П.Ю. Попова, О.М. Кудрявцева, С.А. Бугоркова, А.В. Комиссаров, В.Г. Германчук, Ю.А. Попов

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов, Россия

Резюме. Современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных и диких животных охватывает почти все континенты. Причиной заболевания людей традиционно является контакт с заболевшим животным в процессе ухода за ним, вынужденного его убоя или последующей разделки туши, контакт с инфицированным сырьем животного происхождения. Лицензированные вакцины внесли неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации по сибирской язве, тем не менее, сохраняется актуальность создания вакцин, соответствующих современному уровню науки. Нами разработан прототип вакцины, содержащий рекомбинантный протективный антиген и белок S-слоя EA1, в рецептуру прототипа вакцины включен современный адъювант CpG 2006, показано преимущество лиофилизированной формы препарата. Цель исследования: получение лиофилизированной формы прототипа сибиреязвенной вакцины и проведение анализа соответствия основным требованиям, предъявляемым к вакцинным препаратам. *Материалы и методы.* Выделение рПА и белка EA1 осуществляли из штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔTPA-1Spo⁻ в единой технологической линии, включающей этапы концентрирования, диафильтрации и двухступенчатой хроматографии. Адъювант CpG 2006 синтезировали по известным последовательностям. Компоненты смешивали, лиофилизировали в сублимационной установке. В качестве криопротекторов использовали комбинацию 1% сахарозы и 3% глицина. Иммунизацию лабораторных животных осуществляли подкожно двукратно с интервалом в 2 недели. Эффективность и безопасность препарата оценивали на мышах BALB/c и морских свинках на основе иммунологических, морфометрических и гистологических исследований. Титры антител в сыворотках иммунизированных животных определяли с использованием стандартных процедур твердофазного иммуноферментного анализа. Протективные свойства изучали, определяя величину LD₅₀ тест-заражающего штамма для иммунизированных и контрольных животных и индекс иммунитета. *Результаты.* Проведено комплексное исследование прототипа вакцины сибиреязвенной химической, содержащего в качестве основного и дополнительного антигенов выделенные из штамма *B. anthracis* 55ΔTPA-1Spo⁻ белки, а также адъювант CpG 2006 и стабилизаторы. По физико-химическим свойствам прототип отвечает требованиям к иммунобиологическим лекарственным препаратам, он не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных при подкожном и внутрибрюшинном введении им одной человеческой дозы. Патоморфологические исследования органов морских свинок, иммунизированных двукратно прототипом вакцины, не выявили свидетельств повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма. Установлено, что прототип вакцины защищает линейных мышей при заражении тест-штаммом *B. anthracis* 71/12.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, сибирская язва, сибиреязвенные вакцины, рекомбинантные вакцины, протективный антиген, адъюванты, лиофилизация.

Адрес для переписки:

Микшис Наталья Ивановна
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,
ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (8452) 26-21-31 (служебн.).
E-mail: Mikshis_N@mail.ru

Contacts:

Nataliya I. Mikshis
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe".
Phone: +7 (8452) 26-21-31 (office).
E-mail: Mikshis_N@mail.ru

Библиографическое описание:

Микшис Н.И., Семакова А.П., Попова П.Ю., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Комиссаров А.В., Германчук В.Г., Попов Ю.А. Определение соответствия прототипа рекомбинантной сибиреязвенной вакцины требованиям, предъявляемым к иммунобиологическим препаратам // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 388–392. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-388-392

Citation:

Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A. Compliance of anthrax recombinant vaccine prototype with the requirements to immunobiological preparations // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 388–392. doi: 10.15789/2220-7619-2018-3-388-392

COMPLIANCE OF ANTHRAX RECOMBINANT VACCINE PROTOTYPE WITH THE REQUIREMENTS TO IMMUNE-BIOLOGICAL PREPARATIONS

Mikshis N.I., Semakova A.P., Popova P.Yu., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Komissarov A.V., Germanchuk V.G., Popov Yu.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Current areal of anthrax among live stock and wild animals covers almost all the continents. The cause of human infection is conventionally considered to be the contact with diseased animals in the process of carrying for an animal, forced slaughter or further trimming of carcasses, as well as contact with infected raw materials of animal origin. Licensed vaccines has made an invaluable contribution to the improvement of epidemiological situation on anthrax, however, development of the vaccines complying with current scientific progress remains relevant. We have constructed a vaccine prototype containing recombinant protective antigen and S-layer EA1 protein and added state-of-the-art CpG 2006 adjuvant to the formulation. We have demonstrated the advantage of the lyophilized form of the preparation. Objective — obtainment of anthrax vaccine prototype in lyophilized state and assessment of the prototype compliance with the requirements to vaccine preparations. *Materials and methods.* Isolation of rPA and EA1 protein was carried out using producer-strain *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻ on an integrated end-to-end manufacturing line, including concentration, diafiltration and two-phase chromatography. CpG 2006 adjuvant was synthesized according to known sequences. Components were mixed and lyophilized in sublimation unit. Combination of 1% sucrose and 3% glycine was used as cryoprotector. Effectiveness and safety of the preparation were evaluated on the model of BALB/c mice and guinea pigs applying immunological, morphometric, and histological assays. Antibody titers in sera of immunized animals were evaluated using standard ELISA procedures. Protective properties were investigated through LD₅₀ values for the test-strain used on immunized and control animals and immunity index. *Results.* We have performed complex investigation of the anthrax vaccine prototype, containing *B. anthracis* 55ΔТПА-1Spo⁻ proteins as main and supplementary antigens, as well as CpG 2006 adjuvant, stabilizers and preservative agent. The prototype meets the requirements to immunobiological medicinal drugs by all physical-chemical properties. Our preparation does not have a toxic effect on the organism of laboratory animals in case of subcutaneous and intraperitoneal administration of single human dose. Pathomorphological study of guinea pigs' organs immunized with double dose of the vaccine prototype has not revealed any evidence of damaging effect on the cells and tissues of macroorganism. The prototype protects BALB/c mice from the infection with *B. anthracis* 71/12 test-strain.

Key words: *Bacillus anthracis*, anthrax, anthrax vaccine, recombinant vaccine, protective antigen, adjuvants, lyophilization.

Введение

Несмотря на значительное улучшение эпидемиологической обстановки по сибирской язве, ежегодно в России регистрируют случаи особо опасного заболевания среди людей и восприимчивых животных. Одним из основных факторов риска является наличие на территории страны большого количества скотомогильников. В 2016 г. в Ямало-Ненецком автономном округе возникла крупная эпизоотия среди оленей, на этом фоне были зарегистрированы случаи заболевания людей, в том числе со смертельным исходом. Ликвидация последствий потребовала значительного вложения средств и ресурсов [5]. Не исключена возможность завоза инфицированного сырья животного происхождения, использования микроорганизма в террористических целях.

Эффективной превентивной мерой в отношении сибирской язвы является вакцинопрофилактика сельскохозяйственных животных и населения, входящего в группы риска. В России для иммунопрофилактики сибирской язвы у людей используют живую вакцину отечественного производства на основе штамма *Bacillus anthracis* СТИ-1. За рубежом лицензировано производство химических вакцин AVA (США) и AVP (Великобритания) [11]. Лицензированные вакцины внесли неоценимый вклад в улучшение эпидемиологической ситуации по сибирской язве, тем не менее сохраняется актуальность создания вакцин, соответствующих современному уров-

ню науки. В значительной мере решает проблему остаточной вирулентности и реактогенности вакцин создание препаратов на основе иммуногенных антигенов, синтезируемых рекомбинантными продуцентами, но продукты геномных технологий обладают недостаточной иммуногенностью вследствие отсутствия у них патоген-ассоциированных молекулярных структур микроорганизмов, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета. Следовательно, вакцины на основе рекомбинантных иммуногенных антигенов должны содержать в своем составе адъюванты, неспецифически усиливающие иммунный ответ организма [7]. При выборе адъюванта принимается во внимание его биосовместимость с организмом человека, способность стимулировать опосредованный через толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) врожденный иммунитет. На сегодняшний день существует ограниченный ряд адъювантов, разрешенных к применению на людях или входящих в состав допущенных до клинических испытаний вакцин. К разряду последних относится бактериальная ДНК с высоким содержанием CpG мотивов [8, 10]. При разработке и производстве средств иммунопрофилактики важной задачей является обеспечение стабильности медико-биологических свойств препаратов. Правильный выбор среды высушивания и методических аспектов процесса лиофилизации позволяет увеличить срок годности препарата и свести к минимуму изменение основных характеристик [9].

Ранее нами был создан прототип вакцины сибиреязвенной химической, включающий в качестве иммуногенных компонентов рекомбинантный протективный антиген (рПА) и белок S-слоя EA1. Запатентован биологически безопасный и эффективный способ получения иммуногенных антигенов в одном технологическом цикле из генно-инженерного аспорогенного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻. Антигены охарактеризованы с использованием биохимических, иммунохимических, электронно-микроскопических и иммуномикроскопических методов исследования. Эксперименты на различных биомоделях показали иммунологическую эффективность и безопасность очищенных белковых антигенов [3]. Целью настоящего исследования было получение лиофилизированной формы прототипа сибиреязвенной вакцины и проведение анализа его соответствия основным требованиям, предъявляемым к вакцинным препаратам.

Материалы и методы

В работе использовали тест-заражающий штамм *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского), рекомбинантный аспорогенный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻ (KM97) (Государственная коллекция патогенных бактерий, г. Саратов). Эксперименты проводили на мышах линии BALB/c (20±2 г) и морских свинках (300±20 г) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов) в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Выделение рПА и белка EA1 осуществляли из аспорогенного генно-инженерного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻ согласно разработанному ранее способу [3]. Синтез CpG 2006 осуществляли в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора твердофазным фосфорамидитным способом на автоматическом синтезаторе ASM-800 (Биосет, Россия). В качестве окислителя использовали раствор сульфонирующего реактива 3Н 1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (Sigma, США). Лيوфилизацию проводили в сублимационной сушильной установке Epsilon-2-6 (Martin Christ, Германия). Определение физико-химических свойств прототипа вакцины — дисперсность, герметичность, стерильность, потерю массы при высушивании и рН растворенного препарата осуществляли в соответствии с соответствующими разделами Государственной Фармакопеи Российской Федерации, 12 изд. и МУК 4.1/4.2.588-96 [1, 4]. Определение аномальной токсичности прототипа вакцины осуществляли по ОФС 42-0060-07. Испытание проводили на 10 белых аутбредных мышах и 5 морских свинках. В течение 7 сут проводили осмотр и взвешивание животных. Для определения токсичности по морфологическим показателям иммунизированных морских свинок умерщвляли хлороформом в установленные сроки (по 3 особи на срок). Обработку гистологического материала осуществляли по стандартной методике [2], готовые полу-

тонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Материал просматривали в биологическом микроскопе Olympus CX31 при увеличении в 40–200 раз. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситоморфометрической программы аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (версия 2.1.0.0). Определение титров антител в сыворотках иммунизированных животных с использованием стандартной процедуры твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена применяли очищенный рПА в концентрации 30 мкг/мл. Иммунизацию лабораторных животных (по 20 особей в группе) осуществляли подкожно, двукратно с интервалом в 2 недели. Через 21 день от последней инъекции всех иммунизированных биомоделей заражали тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Линейным мышам вводили по 0,2 мл споровой взвеси тест-штамма в дозах от 1×10^2 до 1×10^5 спор (по 5 иммунизированных особей на дозу). Наблюдение за зараженными животными осуществляли в течение 10 дней. Гибель лабораторных животных от сибиреязвенной инфекции подтверждали данными контрольного вскрытия и результатами высева материала из органов на питательные среды. Вычисляли значения LD₅₀ тест-штамма. Индексы иммунитета определяли как отношение значений LD₅₀ тест-штамма для иммунизированных и интактных животных. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением стандартных методов.

Результаты и обсуждение

В качестве единого источника иммуногенных сибиреязвенных антигенов — рПА и EA1, использовали безопасный и эффективный штамм-продуцент *B. anthracis* 55ΔТПА-1Sp⁻. Выделение рПА осуществляли из стерильного культурального фильтрата, а белок EA1 экстрагировали из части концентрированной биомассы. Используемые в качестве адьюванта последовательности CpG 2006 были синтезированы нами по опубликованным последовательностям.

На следующем этапе компоненты вакцины смешивали таким образом, чтобы на 1 мг очищенного рПА приходилось 500 мкг белка EA1, 4 мг CpG 2006, 0,001% формальдегида. Полуфабрикат стерилизовали через стерилизующие фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. В качестве криопротекторов использовали комбинацию 1% сахарозы и 3% глицина. Фасовку препарата в объеме 100 мл проводили с использованием автоматического дозатора во флаконы вместимостью 10 мл. В каждый флакон вносили по 2,5 см³ препарата. Данный объем эквивалентен 5 человеко-дозам. Одна человеко-доза прототипа вакцины для подкожного введения содержит в объеме 0,5 см³ (50±2) мкг рПА, (25±2) мкг белка EA1, (0,2±0,05) мг CpG 2006, (5±0,5) мг сахарозы, (15±2) мг глицина и (0,001±0,0005)% формальдегида.

Леофильное высушивание проводили в присутствии 1% сахарозы и 3% глицина, так как предварительными экспериментами было показано,

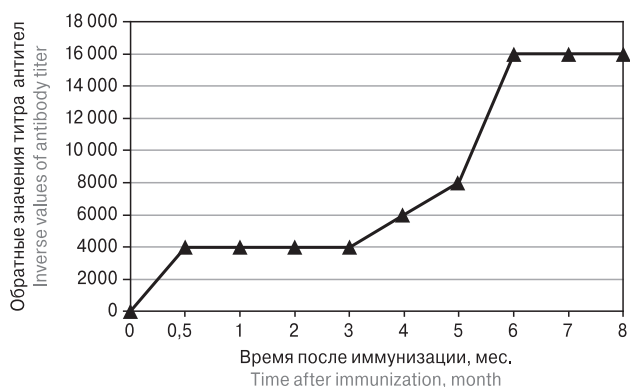


Рисунок. Динамика титров антител в сыворотках морских свинок, иммунизированных прототипом сибиреязвенной химической вакцины

Figure. Antigen titers in sera of guinea pigs immunized with the chemical anthrax vaccine prototype

что при условии использования данных криопротекторов сибиреязвенные антигены сохраняют свои иммуногенные свойства в течение года в условиях хранения при температуре 4°C [6].

Полученный в результате препарат прототипа вакцины сибиреязвенной химической представляет собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета. Содержимое флакона растворяется в течение 30 с в 0,9% растворе натрия хлорида при встряхивании. Растворенный препарат — прозрачная жидкость без посторонних примесей и хлопьев, свободно проходит в шприц через иглу № 0840, рН — 7,2. Потеря массы при высушивании — не более 2%.

В соответствии с требованиями к иммунобиологическим препаратам прототип вакцины сибиреязвенной химической тестировали на аномальную токсичность. Для этого белым аутбредным мышам вводили внутривенно 1 человеко-дозу, что соответствует 5 дозам, определенным для этого вида лабораторных животных. Морским свинкам вводили подкожно 1 человеко-дозу, что эквивалентно 2 дозам для данной биомодели. В течение срока наблюдения все животные были живы, ни у одного из них не выявлено видимых признаков интоксикации. Масса тела в день окончания наблюдения не уменьшилась по сравнению с исходной, за время наблюдения отмечен естественный прирост массы тела мышей и морских свинок. В месте введения препарата ни у одной биомодели не отмечали изъязвлений, абсцессов, некрозов, выраженного отека окружающей клетчатки и кровоизлияний.

Для морских свинок дополнительно проводили патоморфологическое исследование. Биомодели иммунизировали подкожно 1 человеко-дозой прототипа вакцины двукратно (по ½ человеко-дозы на инъекцию), с интервалом 14 дней. Затем животных разных групп умерщвляли на 7, 14 и 34 сут после второй иммунизации, вскрывали и забирали образцы органов для патогистологического исследования. В месте введения препарата незначительный инфильтрат отмеча-

ли только непосредственно после иммунизации. В миокарде не было видимых изменений во все сроки наблюдения. В легких на 7 сут отмечали незначительное скопление клеточных элементов (лимфо-гистиоцитарные узелки) около сосудов, а также умеренные признаки активации — наличие бластов. На протяжении всего исследования воздушность легочной ткани не была нарушена, а минимальные эффекты были обусловлены способом умерщвления животных. Незначительные явления в надпочечниках также укладывались в картину стресс-реакции макроорганизма на вводимый препарат и были обратимы. На 7 сут отмечали очаговые участки дезорганизации коркового вещества, умеренное полнокровие сосудов мозгового вещества, на 14 сут — незначительное полнокровие сосудов пучковой зоны коркового вещества, умеренное снижение феохромии мозгового вещества. Общую направленность изменений стромы паренхиматозных органов (печень, почки) характеризовало умеренное полнокровие сосудов с уменьшением выраженности к 34 сут. Почти двукратное превышение количества клеток Купфера в тканях печени подтверждало функциональную активацию ретикулоэндотелиальной системы. При гистологическом исследовании регионарных, отдаленных лимфатических узлов и селезенки отмечали признаки активации иммунной системы — умеренную гиперплазию фолликулярных структур с признаками клеточной активации Т- и В-зон. В целом патоморфологические исследования органов морских свинок, иммунизированных двукратно прототипом вакцины сибиреязвенной химической, не выявили каких-либо свидетельств повреждающего действия на клетки и ткани макроорганизма.

Для определения титров антител к протективному антигену морских свинок двукратно иммунизировали 1 человеко-дозой (по ½ человеко-дозы на инъекцию). Титры антител были 1:4000 уже через 2 недели после иммунизации. Наиболее высокие значения (1:16 000) отмечали в период от 6 до 8 месяцев наблюдения.

Протективную активность прототипа вакцины сибиреязвенной химической определяли в эксперименте на мышях линии BALB/c. Лабораторных животных иммунизировали однократно ½ человеко-дозы. Значения LD₅₀ тест-заражающего штамма *B. anthracis* 71/12 для иммунизированных и контрольных животных отличались на два порядка — $7,9 \times 10^4$ (15849 ÷ 501187) и $7,9 \times 10^2$ (158 ÷ 3981) соответственно. Для данной биомодели индекс иммунитета составил 100, что соответствует требованиям для данного вида биомоделей.

Таким образом, лиофилизированный препарат прототипа вакцины сибиреязвенной химической представляет собой пористую массу в виде таблетки молочно-белого цвета, хорошо растворимой в воде, он не оказывает токсического действия на организм лабораторных животных при подкожном и внутривенном введении им одной человеко-дозы и защищает

линейных мышей при заражении тест-штаммом *B. anthracis* 71/12. Важно, что иммуногенные компоненты прототипа вакцины — рПА и белок S-слоя EA1, охарактеризованы и подлежат

стандартизации. Разработанный прототип сибирязвенной вакцины и технология его производства соответствует современному состоянию проблемы и мировым аналогам.

Список литературы/References

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Часть 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. 704 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 12th ed. Part 1. M., Scientific Center for Expertise of Medical Applications, 2008. 704 p.]
2. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. М.: СпецЛит., 2010. 96 с. [Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. Osnovy gistologicheskoi tekhniki [Fundamentals of histological technique]. Moscow, SpetsLit, 2010. 96 p.]
3. Микшис Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л. Изучение влияния антигенов, полученных из рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔTnA-1Sp_o-, на органы и ткани иммунизированных животных // Биотехнология. 2017. Т. 33, № 5. С. 45–60. Mikshis N.I., Popova P.Yu., Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L. Effect of antigens obtained from *Bacillus anthracis* 55ΔTnA-1Sp_o-recombinant strain on organs and tissues of immunized animals. *Biotechnologia = Biotechnology*, 2017, vol. 33, no. 5, pp. 45–60. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60 (In Russ.)
4. МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.: 1996. 88 с. [MUK 4.1/4.2.588-96. Methods of controlling medical immunobiological drugs administered to people. M., 1996. 88 c.]
5. Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко Н.К., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., эпидемиологические особенности // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 42–46. [Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nechepurenko L.A., Khar'kov V.V. Outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets autonomous district in 2016, Epidemiological peculiarities. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2016, no. 4, pp. 42–46. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46 (In Russ.)]
6. Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Попова П.Ю., Комиссаров А.В., Микшис Н.И. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы // Биотехнология. 2017. Т. 33, № 3. С. 57–65. [Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Popova P.Yu., Komissarov A.V., Mikshis N.I. Stabilization by freeze-drying of *Bacillus anthracis* immunogenic antigens as a component of anthrax recombinant vaccine prototype. *Biotechnologia = Biotechnology*, 2017, vol. 33, no. 3, pp. 57–65. doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-3-57-65 (In Russ.)]
7. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века // Иммунология. 2009. № 6. С. 324–335. [Semenov B.F., Zverev V.V., Khaïtov R.M. Prognosis of the development of vaccine prevention in the first decades of the XXI century. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 6, pp. 324–335. (In Russ.)]
8. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert. Rev. Vaccines*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 499–511. doi: 10.1586/erv.10.174
9. Kristensen D., Chen D. Stabilization of vaccines: lessons learned. *Hum. Vaccines*, 2003, no. 6, pp. 229–231.
10. Minang J., Inglefield J., Harris A., Lathey J.L., Alleva D.G., Sweeney D.L., Hopkins R.J., Lacy M.J., Bernton E.W. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with anthrax vaccine adsorbed plus CPG 7909 (AV7909). *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 50, pp. 6847–6854. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096
11. Williamson E., Dyson E. Anthrax prophylaxis recent advances and future directions. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6: e1009. doi: 10.3389/fmicb.2015.01009

Авторы:

Микшис Н.И., д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Семакова А.П., к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Попова П.Ю., к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Кудрявцева О.М., к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Бугоркова С.А., д.м.н., зав. отделом иммунологии ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Комиссаров А.В., д.м.н., доцент, зав. отделом экспериментальных фармацевтических форм ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Германчук В.Г., д.м.н., доцент, зав. отделом экспериментальных животных с виварием ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;
Попов Ю.А., д.м.н., профессор, зав. отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

Authors:

Mikshis N.I., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Semakova A.P., PhD (Biology), Senior Research Officer of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Popova P.Yu., PhD (Medicine), Senior Researcher of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Kudryavtseva O.M., PhD (Medicine), Senior Research Officer of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Officer, Head of Immunology Department, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Komissarov A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Experimental Pharmaceutical Forms, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Germanchuk V.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Department of Experimental Animals with Vivarium, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;
Popov Yu.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Educational Programmes and Training of Specialists, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation.

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

Алешкин А.В.	251	Карпунина Л.В.	377	Топтыгина А.П.	341
Алешкин В.А.	251, 361	Карташкина Н.Л.	263	Туранов А.О.	335
Андаев Е.И.	335	Комиссаров А.В.	388	Урбан Ю.Н.	251
Афанасьев М.С.	251	Костинов А.М.	284	Харченко Е.П.	325
Афанасьев С.С.	251, 361	Костинов М.П.	284	Цомартова Д.А.	263
Багиров М.А.	309	Кудаева И.В.	355	Чалык Р.Ю.	316
Бондарева Н.Е.	316	Кудрявцев И.В.	369	Чалык Ю.В.	316
Бондаренко Н.Л.	251	Кудрявцева О.М.	388	Черданцев Д.В.	369
Борисов А.Г.	369	Кузнецов С.Л.	263	Черешнева Е.В.	263
Борисова А.Б.	251, 361	Мамаева Т.А.	341	Шамшева О.В.	361
Борисова О.Ю.	251, 361	Маснавиева Л.Б.	355	Шапкин Ю.Г.	316
Бугоркова С.А.	388	Микшис Н.И.	388	Шепелькова Г.С.	309
Быков А.С.	263	Моргунова Е.Ю.	316	Эргешова А.Э.	309
Валеева Ю.В.	273	Мошев А.В.	369	Agafonov D.A.	383
Владимирова Н.П.	341	Мусин Х.Г.	295	Diallo A.A.	383
Власов Е.В.	361	Наумова М.А.	341	Diallo A.K.	383
Воронина И.С.	361	Несвижский Ю.В.	251	Egorova S.A.	349
Воропаев А.Д.	251	Никитин А.Я.	335	Kaftyreva L.A.	349
Воропаева Е.А.	251	Первова О.В.	369	Khamitova I.V.	383
Гвоздев И.И.	369	Петрова М.С.	361	Lavrentyeva I.N.	383
Германчук В.Г.	388	Пименова А.С.	361	Levkovski A.E.	383
Горельникова Е.А.	377	Поздеев О.К.	273	Makarova M.A.	349
Горячкина В.Л.	263	Поздеев А.О.	273	Matveeva Z.N.	349
Гуляев П.Е.	273	Попов Ю.А.	388	Naydenova E.V.	383
Долмашкина А.С.	377	Попова П.Ю.	388	Senichkina A.M.	383
Евстифеев В.В.	309	Савченко А.А.	369	Slita A.V.	383
Еремеев В.В.	309	Семакова А.П.	388	Sow T.C.	383
Зигангирова Н.А.	316	Смердова М.А.	341	Suzhaeva L.V.	349
Караулов А.В.	251, 263	Стоногина Д.А.	263	Voitenkova E.V.	349
				Zabrovskaja A.V.	349

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет	251	краснуха	341	транцитоз	263
адаптивный иммунный ответ	309	лейкоциты	355	туберкулез	309
адьюванты	388	лекарства нового поколения	295	устойчивость к антибиотикам	295
альвеолярные макрофаги	377	лектин	377	фагоцитоз	377
антиген	263	лиофилизация	388	факторы патогенности	273
антимикробные пептиды	295	лямблии	355	фенотип	369
антитела	341	метаболизм	369	физиологическая иммунодепрессия	251
ацеллюлярная коклюшная вакцина	284	механизмы колонизации	273	физиологическое течение	
бактерии	377	микроРНК	309	беременности	251
безопасность коклюшной вакцины	284	М-клетки	263	функциональная активность	369
беременность	251	мукозальный иммунитет	263	хламидийная инфекция	316
биомаркеры	309	нейтрофилы	369	цитокины	355
вакцины	263	нуклеопротеин	325	anemia	383
внутриутробная инфекция	251	пандемические штаммы	325	antimicrobial susceptibility	349
возраст	361	патогенез	273	<i>Bacillus anthracis</i>	388
врожденный иммунный ответ	309	пациенты	361	beta-lactamase	349
гомеостаз	251	период болезни	361	<i>C. pneumoniae</i>	316
дегидрогеназы	369	перитонеальные макрофаги	377	<i>C. trachomatis</i>	316
дефензины	295	перитонит	369	DNA of parvovirus B19	383
желудочно-кишечный тракт	316	персистентная инфекция	316	<i>E. coli</i>	349
заболеваемость	341	персистрирование	273	<i>Enterobacteriaceae</i>	349
загрязнение воздушной среды	355	подростки	355	GALT	263
изотермальная амплификация	361	популяционный иммунитет	341	H1 гемагглютинин	325
иммунитет	295	природный очаг	335	<i>Helicobacter pylori</i>	273
иммунитет к коклюшу	284	протективный антиген	388	intestine microbiota	349
иммунная прослойка	335	ПЦР	316	<i>K. pneumoniae</i>	349
иммунная система	355	ревакцинация против коклюша	284	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
иммуноглобулины	355	рекомбинантные вакцины	388	ssp. <i>bulgaricus</i>	377
иммуноферментный анализ	335	сборка генома	325	malaria	383
испанский грипп	325	сепсис	369	parvovirus infection	383
кателицидины	295	серомониторинг	341	<i>Plasmodium falciparum</i>	383
клещевой вирусный энцефалит	335	сибирязвенные вакцины	388	RANKL	263
коклюш	284, 361	сибирская язва	388	Republic of Guinea	349
компьютерный анализ	325	слизистая оболочка желудка	273	resistance	349
корь	341	трансляционный код	325	Toll-подобные рецепторы	251

Иллюстрации к статье «Эффективность применения изотермической амплификации при обследовании больных коклюшем» (авторы: А.С. Пименова, О.Ю. Борисова, М.С. Петрова, И.С. Воронина, А.Б. Борисова, О.В. Шамшева, С.С. Афанасьев, Е.В. Власов, В.А. Алешкин) (с. 361–368)

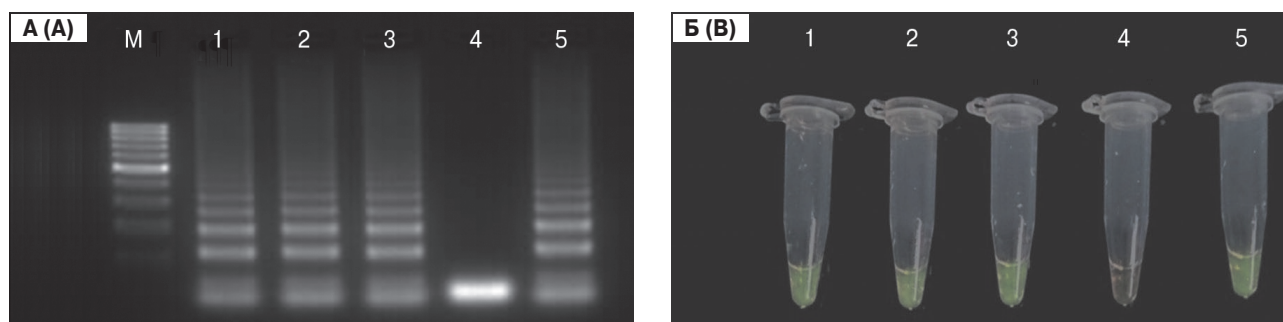


Рисунок. Выявление ДНК *B. pertussis* методом LAMP: детекция продуктов амплификации методом электрофореза (А) и с помощью интеркалирующего красителя (Б)

Figure. Identification DNA of *B. pertussis* by LAMP: detection of products of amplification by method of an electrophoresis (A) and by means of intercalating dye (B)

М — маркер молекулярных весов ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific 1–3 — ДНК штаммов *B. pertussis*; 4 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь); 5 — положительный контроль (ДНК штамма *B. pertussis* № 143).

M — DNA GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific; 1–3 — DNA of *B. pertussis*; 4 — negative control (PCR-mix); 5 — positive control (DNA of *B. pertussis* No. 143).

Подписной индекс:
Роспечать – 95001
Пресса России – 41392

